

**Evaluierung chromogener  
Nährmedien zur Differenzierung von *Candida*-Spezies**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Marianne Streicher  
geboren am 26.03.1988 in Jena**

## **Gutachter**

1. Frau PD Dr. rer. nat. Uta-Christina Hipler, Jena
2. Herr Prof. Dr. med. Udo Markert, Jena
3. Herr Prof. Dr. med. Pietro Nenoff, Mölbis

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.06.2016**

**Abkürzungsverzeichnis**

µL	Mikroliter
°C	Grad Celsius
ALS	agglutinin-like sequence
AMB	Amphotericin-B-Derivate
ANID	Anidulafungin
ATCC	American Type Culture Collection
BD	Beckton, Dickinson and Company
bzw.	beziehungsweise
<i>C. africana</i>	<i>Candida africana</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CAC-B	BBL CHROMagar Candida der Firma BD
CAC-M	Candida ID CHROMagar der Firma Mast
CAS	Caspofungin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
dt.	deutsch
et al.	und andere
etc.	et cetera
Fa.	Firma
FC	Flucytosin
FCZ	Fluconazol
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
g	Gramm

h	Stunde
HWP1	hyphal wall protein 1
Hz	Herz [1/s]
I	intermediär sensibel
ITS	Internal transcribed spacer
ITZ	Itraconazol
L	Liter
m	Masse
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Flugzeitanalyse Massenspektrometrie
MICA	Micafungin
mL	Milliliter
ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
npV	negativ prädikativer Vorhersagewert
NTP	Nukleotidtriphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt.: Polymerasekettenreaktion)
PCZ	Posaconazol
PNA FISH	Peptidnukleinsäure-Floureszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
ppV	positiver prädikativer Vorhersagewert
R	resistent
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RV	Ringversuch
S	sensibel
SAP	sekretorische Aspartatproteinase
SGC2	Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2
<i>spp.</i>	Subspezies
tof/TOF	time off light (Flugzeit)
u.a.	unter anderem
VCZ	Voriconazol
z	Ladungszahl
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung .....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Taxonomie und morphologische Eigenschaften von <i>Candida</i> -Spezies .....	3
2.2 Epidemiologie, Pathogenese und Virulenz von <i>Candida</i> -Spezies.....	4
2.3 Klinik von <i>Candida</i> -Infektionen.....	7
2.3.1 Cutane und Mucocutane Candidosen .....	7
2.3.2 Invasive Candidosen .....	9
2.4 Diagnostik von <i>Candida</i> -Infektionen .....	11
2.4.1 Chromogene Nährmedien .....	12
2.5 Therapie von <i>Candida</i> -Infektionen und Resistenzentwicklung.....	13
3 Zielstellung .....	17
4 Material und Methoden.....	18
4.1 Verwendete Pilzstämme und Pilzanzucht.....	18
4.2 Identifizierung der Pilzstämme .....	19
4.2.1 ID32 C-System .....	19
4.2.2 Anzucht auf Reisagar.....	20
4.2.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	22
4.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	23
4.3 Vorversuche .....	25
4.4 Anzucht auf chromogenen Medien.....	27
4.4.1 MAST ID - CHROMagar Candida.....	27
4.4.2 BBL CHROMagar Candida.....	28
4.4.3 chromID Candida.....	28
4.4.4 CandiSelect 4 .....	29
4.4.5 Candida-Ident-Agar .....	30
4.4.6 Brilliance Candida .....	30
4.5 Fotografie: Stereomikroskop und AxioCam.....	31
4.6 Farbbestimmung: Pantone Matching System .....	32
4.7 Statistische Auswertung.....	32
5 Ergebnisse .....	35
5.1 MAST ID - CHROMagar Candida.....	35
5.2 BBL CHROMagar Candida.....	41
5.3 chromID Candida.....	47
5.4 CandiSelect 4 .....	51
5.5 Candida-Ident-Agar .....	57
5.6 Brilliance Candida .....	62
6 Diskussion.....	67
6.1 Identifizierung der Pilzstämme .....	67

6.1.1 API ID 32 C-System .....	67
6.1.2 Reis-Agar .....	69
6.1.3 MALDI- TOF Massenspektrometrie .....	70
6.1.4 Molekularbiologische Methoden .....	74
6.1.5 Zusammenfassung: Identifizierung der Pilzstämme .....	74
6.2 Chromogene Medien .....	76
6.2.1 BBL CHROMagar Candida und MAST ID - CHROMagar Candida .....	76
6.2.2 chromID Candida .....	79
6.2.3 CandiSelect 4 .....	80
6.2.4 Candida-Ident-Agar .....	81
6.2.5 Brilliance Candida .....	82
6.2.6 Zusammenfassung: Chromogene Medien .....	83
7 Schlussfolgerungen .....	87
8 Literatur- und Quellenverzeichnis .....	89
9 Anhang .....	110

## 1 Zusammenfassung

*Candida*-Infektionen spielen im klinischen Alltag eine zunehmend wichtige Rolle. Sie verursachen nicht nur lokale Infektionen, sondern auch invasive Mykosen, die mit hohen Mortalitätsraten von teilweise mehr als 40 % einhergehen. Wichtigster Vertreter ist dabei *Candida albicans* (*C. albicans*), der rund 50 % aller Candidosen hervorruft. Andere humanpathogene Hefen wie *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*), *Candida krusei* (*C. krusei*), *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*), *Candida lusitanae* (*C. lusitanae*) und *Candida guilliermondii* (*C. guilliermondii*) nehmen jedoch an Häufigkeit und Bedeutung zu. In der Therapie von *Candida*-Infektionen werden abhängig von der Erregeridentität und Resistenzlage verschiedene Substanzklassen eingesetzt. Deshalb kommt der raschen, zielgerichteten Diagnostik, vor allem auch bei steigenden antimykotischen Resistenzen, eine entscheidende Bedeutung zu.

Ziel der Arbeit war es, chromogene Nährmedien verschiedener Hersteller bezüglich ihrer Fähigkeit zur Anzucht und Differenzierung häufig auftretender Erreger von *Candida*-Infektionen sowie der Spezies *Candida africana* (*C. africana*) zu testen und zu vergleichen. Außerdem sollten die konventionellen Methoden Anzucht auf Reisagar, biochemische Identifikation und Anzucht auf chromogenen Nährmedien sowie die neueren Methoden ITS-Sequenzierung und MALDI-TOF Massenspektrometrie hinsichtlich der sicheren Identifizierung von *Candida*-Spezies verglichen werden.

Die Untersuchungen wurden an 107 Hefepilzstämmen der Spezies *Candida* durchgeführt. Davon stammten 87 Proben aus Pilzkulturen der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena, die aus Patientenmaterial isoliert worden sind. Fünf Stämme der Subspezies *C. africana* stellte Prof. Dr. med. habil. H.-J. Tietz, Leiter des Instituts für Pilzkrankheiten und Mikrobiologie in Berlin, zur Verfügung. Weitere 15 Stämme waren Referenz- und Ringversuchsstämme. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Hefen auf SGC2-Agar angezüchtet und mittels Reisagarkultivierung, API ID 32C-Testung, MALDI-TOF MS und ITS-Sequenzierung getestet. Es konnten 101 Stämme ermittelt werden, die als richtig positive Proben in die Testreihe eingeschlossen wurden. Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen erfolgten Vorversuche, in denen die verwendete Keimzahl (Mc Farland-Trübung 1, Inoculummenge 25µL), die Ausstrichtechnik mit dem Verdünnungsimpfstrich und die Bebrütungstemperatur von 37 °C festgelegt wurden.

Die Anzucht der *Candida*-Stämme gelang auf BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida, chromID Candida und CandiSelect 4 mit einer Sensitivität von 1, auf Candida-Ident-Agar mit 0,96 und auf Brilliance Candida mit 0,94. BBL CHROMagar Candida und MAST ID - CHROMagar Candida erlaubten nach 48/72 Stunden die Differenzierung von *C. krusei* (Sensitivität je 1), *C. tropicalis* (Sensitivität 1/1 bzw. 0,8/0,6) und *C. africana* (Sensitivität je 1/1). *C. albicans* und *C. dubliniensis* bildeten grüne bis türkise Färbungen aus und konnten nicht unterschieden werden. Auf chromID Candida konnte ausschließlich *C. krusei* nach 48/72 Stunden eindeutig bestimmt werden (Sensitivität je 0,8). CandiSelect 4 ermöglichte nach 72 Stunden die Identifizierung von *C. africana* (Sensitivität 0,86), *C. albicans* (Sensitivität 1) und *C. dubliniensis* (Sensitivität 0,95) sowie nach 48/72 Stunden die Bestimmung von *C. krusei* (Sensitivität je 0,99). Auf Candida-Ident-Agar konnten *C. africana* nach 72 Stunden (Sensitivität 1) sowie *C. albicans* (Sensitivität 1) und *C. dubliniensis* nach 48 Stunden (Sensitivität 0,91) sicher erkannt werden. Brilliance Candida erlaubte die Differenzierung von *C. albicans* nach 72 Stunden (Sensitivität 0,97) sowie von *C. dubliniensis* (Sensitivität 0,95/1) und *C. krusei* nach 48/72 Stunden (Sensitivität je 1/1). Die weiteren Testverfahren ergaben deutlich höhere Gesamtsensitivitäten für die eindeutige Identifizierung der Subspezies (Reisagarkultivierung, API ID 32C-Testung und MALDI-TOF MS: 0,89, ITS-Sequenzierung: 0,93). Eine Bestimmung von *C. africana* war ausschließlich mit Hilfe der Reisagarkultivierung, API ID 32C-Testung (visuelle Ablesung) und der Testung auf den chromogenen Nährmedien BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida, CandiSelect 4 und Candida-Ident-Agar möglich.

Chromogene Medien eignen sich sehr gut zur Anzucht und Identifizierung von *Candida*-Spezies. Einige Subspezies können bereits mittels der charakteristischen Färbung eindeutig differenziert werden. Im Vergleich der chromogenen Nährmedien erwies sich CandiSelect 4 als aussagekräftigster Test. Den geringsten Informationsgewinn bot chromID Candida. Vorteile chromogener Nährmedien gegenüber anderer Testverfahren sind die Nutzung als Kultivierungsmedium und die Detektion von Mischkulturen. Zur weiteren Bestimmung eignen sich die Reisagarkultivierung und API ID 32C-Testung. Die ITS-Sequenzierung und MALDI-TOF MS sind schnellere, aber preisintensivere Methoden, die vor allem in der Diagnostik systemischer *Candida*-Infektionen, die eines raschen Therapiebeginns bedürfen, zur Anwendung kommen sollten.



## 2 Einleitung

### 2.1 Taxonomie und morphologische Eigenschaften von *Candida*-Spezies

Pilze gehören, wie Tier- und Pflanzenzellen, zu den Eukaryonten und zeichnen sich durch das Vorhandensein eines Zellkerns aus. Sie werden in Eumyceten (echte Pilze), Oomyceten (Scheinpilze) und Myxomyceten (Schleimpilze) unterteilt, wobei die beiden letzteren eher mit Algen bzw. Amöben verwandt sind (Kothe 2007). Humanpathogene Pilze finden sich in der Gruppe der echten Pilze und lassen sich den Ascomyzeten (Schlauchpilze), Basidiomyceten (Ständerpilze) und Zygomyceten (Jochpilze) zuordnen (Guarro et al. 1999). Weiterhin können echte Pilze anhand der Art ihrer Fortpflanzung unterschieden werden. Dabei werden Pilze in ihrer sexuellen, telemorphen Form als Fungi perfecti und Pilze in ihrer asexuellen, anamorphen Form als Fungi imperfecti oder auch Deuteromyceten bezeichnet (Hof und Dörries 2009). Einige Pilze können beide Formen annehmen (Kurtzmann et al. 1999). Die Gattung *Candida* zählt zu den Ascomyzeten und umfasst laut Kurtzmann et al. (1999) 163 anamorphe Subspezies, die in mindestens 13 Fällen telemorphe Formen bilden können. Anamorphe und Telemorphe derselben Subspezies haben z.T. verschiedene Namen, wie z.B. *Candida krusei* (Anamorphe) und *Issatchenkia orientalis* (Telemorphe).

In der Medizin erfolgt die Einteilung der Pilze nach einem anderen System, dem DHS-System. Dieses unterscheidet zwischen Dermatophyten, Hefe- und Schimmelpilzen (Rieth 1967). *Candida*-Subspezies (*Candida spp.*) werden zur Gruppe der Hefen gezählt, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften auch als Sprosspilze bezeichnet werden (Nenoff 2010).

Sprosspilze bestehen aus einzelnen ovalen Zellen, den Blastosporen, die sich durch Abschnürung einer Tochterzelle von der Mutterzelle vermehren (Nenoff 2010). Trennt sich die Tochterzelle nicht von der Mutterzelle und zeigt ein längliches, gestrecktes Wachstum, entsteht sogenanntes Pseudomycel (Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990). Die Subspezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* bilden unter nährstoffarmen Bedingungen außerdem asexuelle Pilzsporen, die Chlamydosporen, aus. Diese dienen vor allem dem Überleben, weniger der Verbreitung des Organismus (Dörfelt und Jetschke 2001). Die morphologischen Eigenschaften können mikroskopisch sichtbar gemacht werden und liefern wertvolle Hinweise für die Artbestimmung.

## 2.2 Epidemiologie, Pathogenese und Virulenz von *Candida*-Spezies

Bis heute sind mehr als 200 *Candida*-Arten bekannt, die weit verbreitet in der Umwelt vorkommen (Hof und Dörries 2009). Obwohl davon nur wenige als Krankheitserreger von Bedeutung sind (Ruhnke et al. 2011), machen *Candida*-Spezies den größten Teil der von Hefen verursachten Infektionen aus (Christ et al. 1996). Wichtigster Vertreter ist dabei *C. albicans* (Abi-Said et al. 1997, Lagrou et al. 2007), der rund 50 % aller Candidosen hervorruft (Quindós 2014). Andere humanpathogene Hefen wie *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* und *C. guilliermondii* nehmen jedoch an Häufigkeit und Bedeutung zu (Abi-Said et al. 1997, Pfaller et al. 2011, Quindós 2014, Ruhnke 2006, Wingard 1995). Insgesamt ist ein Anstieg von Pilzinfektionen im Allgemeinen und speziell von *Candida*-Infektionen in den letzten Jahrzehnten zu beobachten (Wingard 1995, Martin et al. 2003).

Hefen der Gattung *Candida* gehören zu den opportunistischen Krankheitserregern. Sie besiedeln bei 25 – 50 % aller gesunden Menschen die Schleimhäute und sind als primär nicht pathogene Keime vor allem im Nasen-Rachen-Raum, dem Verdauungstrakt und dem äußeren Genitale zu finden (Ruhnke et al. 2011, Seeliger und Heymer 1981, Taschdjian et al. 1970). Unter bestimmten Bedingungen kommt es zu einem Übertritt des Erregers in ein parasitäres, pathogenes Stadium mit starker Vermehrung der Zellzahl und Ausbildung von *Candida*-Plaques, von wo aus ein Eindringen in die Blutbahn erfolgen kann (Rupec und Korting 2003, Seeliger und Heymer 1981). Entscheidend für das Entstehen einer Infektion sind prädisponierende Faktoren und der Immunstatus des Patienten sowie Virulenzfaktoren der Hefe (Nenoff 2010, Rupec und Korting 2003).

Ein wesentlicher Risikofaktor ist die antibiotische Langzeittherapie oder Therapie mit Breitspektrumantibiotika und nachfolgender Reduktion oder Beseitigung der physiologischen Bakterienflora (Al-Rawahi und Roscoe 2013, Patolia et al. 2013, Smith 1973). Von großer Bedeutung ist auch die mechanische Verletzung körpereigener Barrieren wie z.B. der Haut oder der Darmschleimhaut durch Traumata, venöse Katheterisierung, Verbrennungen oder chirurgische Eingriffe (Al-Rawahi und Roscoe 2014, Nenoff 2010, Smith 1973). Opportunistische oder exogene Erreger sind dann in der Lage, diese Barriere zu überwinden und ins Gewebe oder den Blutkreislauf einzudringen. Insbesondere die Abdominalchirurgie ist ein prädisponierender Faktor für die Entstehung von *Candida*-Mykosen (Al-Rawahi und Roscoe 2013, Calandra et al. 1989, Giamarellou und Antoniadou 1996, Maertens et al. 2001). Venöse Katheter bergen, genau wie andere

bioprothetische Devices, ein zusätzliches Infektionspotenzial. Sie dienen *Candida*-Spezies als Substrat zur Ausbildung eines Biofilms, der die Erreger gegen diverse Antimykotika unempfindlicher macht (Al-Fattani und Douglas 2004, Ramage et al. 2012). Weitere Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, schlechte Körperhygiene, heißes und feuchtes Klima, sowie das Tragen von Windeln und Zahnprothesen (Hof und Dörries 2009, Rupec und Korting 2003, Smith 1973). Auch hormonelle Einflüsse spielen vor allem für die Entstehung von Vulvovaginalcandidosen eine Rolle. Aufgrund eines Östrogenüberschusses z.B. infolge einer oralen Kontrazeption oder Schwangerschaft kann es zur starken Vermehrung von *Candida*-Hefen kommen (Mendling 2015, Seeliger und Heymer 1981, Traidl-Hoffmann et al. 2010). Außerdem stellt die Kolonisation der Schleimhaut per se einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von lokalen Infektionen und von Candidämien dar (Manzoni et al. 2006, Patolia et al. 2013, Tortorano et al. 2004). Patienten einer Intensivstation sind im Allgemeinen besonders gefährdet, an einer invasiven Candidose zu erkranken (Maertens et al. 2001). Von großer Bedeutung sind dabei eine Verlängerung der Verweildauer auf der Intensivstation, Nierenversagen, Hämodialyse, Therapie mit Breitspektrumantibiotika, Diabetes mellitus, Vorhandensein eines Zentralvenösen Katheters, totale parenterale Ernährung, immunsuppressive Therapie einschließlich Chemotherapie, akute Pancreatitis, eine *Candida*-Kolonisation in mehreren Körperregionen, Chirurgie und Transplantation (Blumberg et al. 2001, Ostrosky-Zeichner und Pappas 2006, Saiman et al. 2000).

Ein intaktes Immunsystem spielt für die Verhinderung einer Mykose eine entscheidende Rolle. Bei der Abwehr von Pilzen sind neutrophile Granulozyten, die *Candida*-Spezies mit Hilfe sogenannter Neutrophil Extracellular Traps (NETs, dt.: neutrophile, extrazelluläre Fallen) unschädlich machen und abtöten, von großer Bedeutung (Byrd et al. 2013, Cockayne und Odds 1984, Urban et al. 2006, Urban et al. 2009). Aber auch T-Lymphozyten verhindern die Ausbreitung der *Candida*-Spezies im menschlichen Körper, indem sie als T-Helferzellen vom Typ 1 über Zytokine Makrophagen aktivieren, die die Pilzzellen phagozytieren (Farah et al. 2002, Romani 2011). Eine qualitative oder quantitative Beeinträchtigung der neutrophilen Granulozyten und/oder T-Lymphozyten hat deshalb häufig eine oberflächliche oder systemische Candidose zur Folge (Hof und Dörries 2009, Rubpec und Korting 2003). Ausgeprägte Neutropenien oder langanhaltende neutropenische Phasen entstehen z.B. infolge maligner hämatologischer Erkrankungen und damit verbundener Chemotherapien (Al-Rawahi et al. 2013, Maertens et al. 2001, Smith 1973). Die zelluläre Immunität kann aufgrund einer Zytostatikatherapie,

immunsuppressiven Therapie, Transplantation oder HIV-Infektion supprimiert sein (Al-Rawahi et al. 2013, Maertens et al. 2001, Smith 1973).

Nicht zuletzt ist das Entstehen einer *Candida*-Infektion vom Zusammenwirken verschiedener Virulenzfaktoren des Erregers abhängig (Naglik et al. 2004, Schaller 2005). Dabei spielen Faktoren zur Adhärenz, Gewebepenetration und -Persistenz eine Rolle (Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990). Das Adhärenzvermögen von *Candida*-Arten an Epithelien ist ein wesentlicher Bestandteil für das Entstehen einer Infektion (Cannon et al. 1995, Silva et al. 2012, Yang 2003). Es wird vor allem über Zellwandbestandteile, wie Mannane und Mannanadhesine, vermittelt (Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990, Vázquez-González et al. 2013). Neben diesen Mannoproteinen ermöglichen auch Fimbrien, Integrine und andere Glykoproteine die Bindung an Epithelien und extrazelluläre Matrix (Borg-von Zepelin und Monod 2003, Cannon et al. 1995, Lopez et al. 2014). Zusätzlich erfolgt ein Gestaltwechsel von Hefe- zu Hyphenform, der als Dimorphismus bezeichnet wird und durch Umgebungsbedingungen angeregt wird (Cannon et al. 1995, Whiteway und Oberholzer 2004, Vázquez-González et al. 2013). Während der Hyphenbildung werden HWP1 (hyphal wall protein 1)- und ALS (agglutinin-like sequence)-Proteine exprimiert, die die Adhärenz zusätzlich fördern (Borg-von Zepelin und Monod 2003). Außerdem spielt die Hyphenform für die Überwindung epithelialer Barrieren eine wichtige Rolle (Jayatilake et al. 2006, Silva et al. 2012). Für die Gewebsinvasion sind aber vor allem der Thigmotropismus, das heißt die Fähigkeit interzelluläre Verbindungen von Schleimhautepithelien zu erkennen und gezielt zu penetrieren, sowie die Sekretion hydrolytischer Enzyme wie Lipasen, Phospholipasen, Hämolsine und Proteinasen von Bedeutung (Kantarcioğlu und Yücel 2002, Schaller 2005, Silva et al. 2012, Vázquez-González et al. 2013). Der Sekretion hydrolytischer Enzyme, insbesondere der Aspartatproteinase, wird unter allen Virulenzfaktoren eine zentrale Rolle zugeschrieben (Borg-von Zepelin und Monod 2003, Naglik 2004, Naglik et al. 2008). Für die Spezies *Candida* sind zehn sekretorische Aspartatproteinasen (SAP1-10) bekannt, die jeweils von verschiedenen Genen codiert werden (Schaller 2005). Dabei sind SAP1-3 vor allem für lokale und SAP4-6 für systemische Infektionen von Bedeutung (Jayatilake et al. 2006, Schaller 2005). Naglik et al. (2003) konnten außerdem feststellen, dass die Expression der SAP-Gene auch mit anderen Virulenzeigenschaften wie Hyphenbildung, Adhäsion und phänotypischem Switching assoziiert sind. Das Überleben der Hefe im Gewebe wird durch phänotypisches Switching und molekulares Mimicry gesichert (Hof und Dörries 2009, Luo et al. 2013). Als phänotypisches Switching wird die Tatsache

bezeichnet, dass *Candida*-Kolonien reversibel zwischen zwei morphologischen Formen mit verschiedenem Genexpressionsmustern wechseln können (Soll 2003). Damit verbunden sind unterschiedliche Adhärenzeigenschaften, Antigenexpression, Enzym- und Toxinproduktion, Gewebeaffinität sowie Resistenzmechanismen (Soll 2003, Vázquez-González et al. 2013). Zusätzlich sind *Candida*-Spezies dazu in der Lage, Zelloberflächenrezeptoren zu exprimieren, die C3b-Moleküle des Komplementsystems binden (Borg-von Zepelin und Monod 2003). Durch die Vernetzung opsonierter und nicht opsonierter Blastosporen entstehen Aggregate, die die Hefen vor Phagozytierung schützen (Mishra et al. 2007). Außerdem können *Candida*-Spezies durch Bildung von Prostaglandinen, die die Lymphozytenproliferation hemmen, scheinbar direkt in die zelluläre Immunantwort eingreifen (Alem und Douglas 2005, Erb-Downward und Noverr 2007).

*C. albicans* weist das größte Spektrum an Virulenzfaktoren auf (Odds 1987). Insgesamt ist eine höhere Pathogenität zu beobachten als bei *Non-albicans-Candida*-Spezies (Jayatilake et al. 2006). Arendrup et al. (2002) stellten ebenfalls große Unterschiede in der Pathogenität verschiedener *Candida*-Spezies fest und klassifizierten diese in drei Gruppen mit absteigender Pathogenität: I: *C. albicans* und *C. tropicalis*, II: *C. glabrata*, *C. lusitaniae* und *Candida kefyr* sowie III: *C. parapsilosis*, *C. krusei* und *C. guilliermondii*.

## **2.3 Klinik von *Candida*-Infektionen**

Da *Candida*-Spezies opportunistische Krankheitserreger sind, erfolgt eine Infektion meist endogen ausgehend von der lokalen Schleimhautflora. In seltenen Fällen kann es aber auch zur einer exogenen Infektion, z.B. durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung, kommen (Nenoff 2010, Rupec und Korting 2003, Seeliger und Heymer 1981). Bei intaktem Immunsystem treten Candidosen für gewöhnlich ausschließlich lokal begrenzt auf Haut und Schleimhäuten auf. Kommt es zu einer Beeinträchtigung der körpereigenen Abwehr, kann sich die Infektion ausbreiten und Candidämien, metastatische Abszesse und Streuherde verursachen (Taschdijan et al. 1970).

### **2.3.1 Cutane und Mucocutane Candidosen**

Die Cutane Candidose manifestiert sich als Candidosis intertriginosa in großen Hautfalten wie der Leiste, Rima ani, Submammär- und Bauchfalte sowie als Candidosis interdigitalis in den Zehen- und Fingerzwischenräumen, als erythematöse, erosive und schuppige Läsionen, die mazerieren können (Seebacher et al. 2006, Nenoff 2010, Vázquez-González et al. 2013). Auf der freien Haut zeigt sie sich in Form erythematöser, meist nässender Erosion mit halskrausenartiger Schuppung (Nenoff 2010, Rupec und Korting 2003,

Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990). Als Sonderform der kutanen Candidose finden sich bei der Windeldermatitis erosive, mazerierte Läsionen sowie weißliche Beläge und Schuppung (Nenoff 2010). Sie entsteht, indem *Candida*-Spezies mit dem Stuhl auf die Haut gelangen und sich im feucht-warmen Milieu unter der Windel vermehren (Seebacher 2006, Traidl-Hoffmann et al. 2010). Auch der Befall des Nagelfalzes (Paronychie) und nachfolgend des Nagelorgans (Onychomykose) ist möglich und zeichnet sich durch eine Druckdolenz und ödematös aufgetriebener Rötung des proximalen und lateralen Nagelfalzes aus. Bei Fortbestehen der Entzündung kann es zur Schädigung der Nagelmatrix mit strukturellen Nagelveränderungen kommen (Seebacher et al. 2007, Rupec und Korting 2003, Vázquez-González et al. 2013). Häufigster Erreger cutaner Candidosen ist *C. albicans*, gefolgt von *C. guilliermondii*, *C. glabrata* und *C. krusei* (Nenoff 2010).

Eine Oropharyngeale Candidose kann nur bei gleichzeitigem Auftreten einer *Candida*-Besiedlung der Mundschleimhaut und prädisponierenden Faktoren, wie einer chronischen Reizung durch Zahnprothesen oder einer Störung des Immunsystems, auftreten (Reinel et al. 2008, Rupec und Korting 2003). Die akute pseudomembranöse Candidose, auch Soor genannt, zeichnet sich durch weißliche, abwischbare Beläge auf einer hochroten, leicht blutenden Schleimhaut auf Wangen, Zunge und Gaumen aus (Reinel et al. 2008, Vázquez-González et al. 2013). Die akute und, bei ausbleibender Behandlung, chronisch atrophische Candidose fällt durch gerötete, schmerzhaft Mucosabereiche auf. Sie wird auch als Prothesen-Stomatitis bezeichnet und kommt vor allem bei älteren Menschen mit Diabetes mellitus vor (Reinel et al. 2008, Rupec und Korting 2003). Die chronisch hyperplastische Candidose geht mit einem Eindringen der Hefen in tiefere Schleimhautschichten einher und imponiert als weiße, nicht wegwiszbare Beläge (*Candida*-Leukoplakie) (Nenoff 2010, Reinel et al. 2008, Rupec und Korting 2003). Weitere Formen sind die Perlèche (Angulus infectiosus) des Mundwinkels und die seltene *Candida*-Cheilitis (Nenoff 2010, Reinel et al. 2008). Wichtigster Erreger ist ebenfalls *C. albicans* (Reinel et al. 2008). Neben anderen *Non-albicans-Candida*-Spezies konnte bei HIV-Infizierten auch *C. dubliniensis* isoliert werden (Coleman et al. 1997, Reinel et al. 2008, Sullivan et al. 1999).

Die Chronische mucocutane Candidose tritt in seltenen Fällen bei immunsupprimierten Patienten auf. Ausgehend von einer *Candida*-Stomatitis, z.T. mit Soorbelägen, kommt es zu einer Infektion der Haut und Nägel (Nenoff 2009, Seebacher et al. 2006). Häufigster Erreger ist *C. albicans* (Seebacher et al. 2006).

Genitale Candidosen manifestieren sich bei der Frau als Vulvovaginalcandidose und beim Mann als Balanitis oder Balanoposthitis. Symptome der Frau sind Juckreiz und Brennen, Rötung und gegebenenfalls Schwellung des Introitus vaginae sowie ein weißer, krümeliger Fluor (Mendling 2015, Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990, Traidl-Hoffmann et al. 2010). *C. albicans* verursacht den größten Teil aller vulvovaginalen Infektionen, gefolgt von *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* und anderen *Candida*-Spezies (Mendling und Seebacher 2003). Auch die 2001 von Tietz et al. erstmals beschriebene Spezies *C. africana* wird als Erreger von Vulvovaginalcandidosen angesehen (Gumral et al. 2011, Romeo und Griseo 2010). Beim Mann kommt es zu einer Entzündung der Glans penis, des Sulcus coronarius, des inneren Präputialblattes, der Urethra und gelegentlich der Samenwege (Seebacher et al. 2006). Klinisch zeigen sich eine leichte Rötung, Schwellung und Juckreiz, Papeln mit weißlichen Belägen sowie Ulzerationen bei der erosiven Form. (Nenoff 2010, Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990). Typische Erreger sind *C. albicans*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata* (Nenoff et al. 2010).

### 2.3.2 Invasive Candidosen

Invasive Candidosen zählen zu den am häufigsten auftretenden potenziell lebensbedrohlichen Pilzerkrankung, vor allem auf Intensivstationen, mit Mortalitätsraten von 19 bis 61 % (Gudlaugson et al. 2003, Morgan et al. 2005, Pfaller et al. 2014, Tortorano et al. 2004, Wisplinghoff et al. 2004). Invasive Candidosen manifestieren sich als isolierte Candidämien oder isolierter bzw. disseminierter Organbefall mit oder ohne Candidämie. Klinisch können sich invasive Candidosen durch Fieber, sepsisähnliche Symptome und allgemeine Infektionszeichen mit Mikroabszessen oder Infarkten verschiedener Organe präsentieren (Ruhnke et al. 2011, Seeliger und Heymer 1981). Das Erregerspektrum umfasst *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* und andere *Non-albicans-Candida*-Spezies, wobei *C. albicans* mit rund 55 % aller invasiven Candidosen nach wie vor an erster und *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* länderspezifisch an zweiter Stelle stehen (Almirante et al. 2006, Arendrup et al. 2005, des Champs-Bro et al. 2011, Gudlaugson et al. 2003, Pinho Resende et al. 2002, Ruhnke et al. 2011, Tortorano et al. 2004). Die *Candida*-Spezies unterscheiden sich in Mortalitätsraten und Manifestationsformen. Die höchste Mortalität zeigt sich bei Infektionen mit *C. tropicalis* und *C. glabrata* mit mehr als 40 %, die niedrigste bei *C. parapsilosis* mit bis zu 26 % (Tortorano et al. 2004). Typische Manifestationsformen der verschiedenen Subspezies sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Es fällt auf, dass *C.-glabrata*-Infektionen vermehrt bei älteren Patienten mit soliden Tumoren, *C.-parapsilosis*-Infektionen hingegen

vor allem bei jüngeren und frisch operierten Patienten zu finden sind (Pfaller et al. 2014, Tortorano et al. 2001). Vor allem auf neonatalen Intensivstationen ist *C. parapsilosis* als Erreger invasiver Pilzinfektionen immer häufiger zu finden (Baptista et al. 2014, Oeser et al. 2014, Pfaller et al. 2014).

<b><i>Candida</i> spp.</b>	<b>Klinische Manifestation</b>
<i>C. albicans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucocutane Candidosen: Oropharyngeale Candidose, Ösophagitis, Vulvovaginitis, <i>Candida</i>-Balanitis</li> <li>- Cutane Candidosen</li> <li>- Invasive Candidosen: Candidämie, Meningitis, Infektionen von Leber und Milz, Pyelonephritis, Peritonitis, Pancreatitis</li> </ul>
<i>C. parapsilosis</i>	- Candidämie, tiefe Infektionen assoziiert mit implantierten Devices (Endokarditis, Peritonitis nach Peritonealdialyse, Endophthalmitis nach Linsentransplantat, septische Arthritis), Infektionen durch kontaminierte Lösungen
<i>C. tropicalis</i>	- Candidämie und septische Candidose bei immunsupprimierten Patienten
<i>C. glabrata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucocutane Candidosen: Soor bei AIDS-Patienten</li> <li>- Systemische Candidosen, Candidämie (v.a. bei soliden Tumoren unter Polychemotherapie), Infektion des Harntrakts</li> </ul>
<i>C. krusei</i>	- Candidämie, Endophthalmitis, Diarrhö Neugeborener
<i>C. dubliniensis</i>	- Oropharyngeale Infektionen bei HIV-Patienten
<i>C. guilliermondii</i>	- Systemische Candidose. Endocarditis bei i.v.-Drogenabhängigen

**Tabelle 2.1** Klinische Manifestationen von *Candida*-Spezies (Eggimann et al. 2003, Hof und Dörries 2009)

Candidämien ohne Organbeteiligung sind die häufigste Manifestationsform invasiver Candidosen (Glöckner 2010, Ruhnke et al. 2011). Klinisch findet sich typischerweise Fieber (Ruhnke et al. 2011). Candidämien können in eine schwere Sepsis oder septischen Schock übergehen und zeigen hohe Mortalitätsraten (Wisplinghoff et al. 2006).

Durch Organbefall rufen invasive Candidosen, in Abhängigkeit vom betroffenen Organ und dem Ausmaß der Schädigung, vielfältige klinische Bilder hervor. Betroffen sein können das zentrale Nervensystem (Meningoencephalitis, Ventrikulitis), das Auge (Endophthalmitis, Chorioretinitis, Keratitis), das Herz (Pericarditis, Endocarditis), das Atmungssystem (Pneumonie, Larynx-Candidose), das Peritoneum (Peritonitis), der Bewegungsapparat (Osteomyelitis, Arthritis), der Urogenitaltrakt (Zystitis, Pyelitis, Nierenabszesse) sowie Leber und Milz (hepatosplenische Candidose) (Ruhnke et al. 2011, Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990, Seeliger und Heymer 1981).



## 2.4 Diagnostik von *Candida*-Infektionen

Der Nachweis von Sprosspilzen der Gattung *Candida* ist mit Hilfe verschiedener Methoden möglich. Zum Nachweis einer Infektion wird Untersuchungsmaterial aus Abstrichen von Haut und Schleimhaut, Schuppen, Nagelmaterial und bei Verdacht auf eine invasive Candidose bevorzugt aus sterilen klinischen Proben oder Geweben gewonnen. Werden Hefen aus unsterilen Proben, wie z.B. Sputum, isoliert, ist die Differenzierung zwischen einer *Candida*-Kolonisation und -Infektion nicht sicher möglich (Ruhnke et al. 2011, Seeliger und Heymer 1981).

Der mikroskopische Nachweis kann am Nativpräparat oder am gefärbten Objekt erfolgen, wobei sich Blastosporen und Pseudomycel im Nativpräparat durch anschließende Methylenblaufärbung oder die sensitivere Fluoreszenzfärbung mit einem optischen Aufheller wie Blankophor oder Calcofluor/Weiß und im histologischen Präparat durch Perjodsäure-Schiff(PAS)-Färbung oder Gram-Färbung leichter identifizieren lassen (Nenoff et al. 2005, Nenoff et al. 2014, Rüchel und Schaffrinski 1999, Rüchel et al. 2004, Seebacher et al. 2010, Seeliger und Heymer 1981). Für den kulturellen Nachweis wird Sabouraud-Glucose-Agar genutzt, auf dem *Candida*-Spezies nach einer Inkubation bei 26 bis 36°C für 24 bis 48 Stunden weiße bis cremefarbene Kolonien bilden (Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990, Rupec und Korting 2003). Einige Arten können bereits anhand der Kulturmorphologie differenziert werden, die sich von der typischen glatten, glänzenden Wuchsform unterscheidet (de Hoog et al. 2000). *C. krusei* bildet beispielsweise flache, raue Kolonien mit unregelmäßigem Rand (Crissey 1995, de Hoog et al. 2000). Die kulturelle Anzucht bietet außerdem die Möglichkeit einer semiquantitativen Keimzahlbestimmung durch Auszählen der Kolonien (Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990). Gelingt der mikroskopische und kulturelle Nachweis nicht, können bei Verdacht auf eine invasive Candidose serologische Methoden angewendet werden (Hof und Dörries 2009). Es gibt eine Reihe kommerzieller Tests, die unspezifische *Candida*-Antigene, Keimschlauch-Antigene, Mannan und  $\beta$ -D-Glucan detektieren. Diese werden aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Sensitivität und Spezifität jedoch nicht routinemäßig eingesetzt (Arvanitis et al. 2014, Bär und Hecker 2002, Persat et al. 2002, Ruhnke et al. 2011).

Nach erfolgreicher Kultivierung ist eine exakte Differenzierung der Spezies sinnvoll. Auch hier bieten sich verschiedene Möglichkeiten. Bei der Anzucht auf Mangelmedien, wie z.B. Reisagar, kommt es zur vermehrten Bildung von Myzel, Pseudomyzel und

Chlamydosporen, sodass mit Hilfe der charakteristischen mikromorphologischen Eigenschaften die Subspezies unterschieden werden können (Rieth 1995, Kozłowska 1995). Biochemische Tests, wie z.B. das API ID32 C- oder Vitek2-System (bioMérieux), nutzen die speziestypischen Kohlenhydratassimilationsmuster zur Identifizierung der *Candida*-Hefen (Nenoff et al. 2005). Außerdem kann die Differenzierung der Subspezies mit Hilfe chromogener Nährmedien erfolgen, auf die im nachfolgenden Kapitel genauer eingegangen wird. Reisagarkultivierung, biochemische Tests und die Anzucht auf chromogenen Nährmedien zählen zu den konventionellen, phänotypischen Tests. Diese sind zeitaufwändig (24 bis 72 Stunden) und können seltenere Subspezies nicht erkennen (Durán-Valle et al. 2014). Bedenkt man, dass auch die Kultivierung 24 bis 48 Stunden benötigt, zeigt sich, dass es durch die Diagnostik zu einem verzögerten Beginn der zielgerichteten antimykotischen Therapie kommen kann (Arvanitis et al. 2014).

Vor allem bei invasiven Candidosen ist ein frühzeitiger, zielgerichteter Therapiebeginn für das klinische Outcome entscheidend (Garey et al. 2006, Zilberberg et al. 2010). Deshalb rücken neue, schnellere Methoden immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit. Die Peptidnukleinsäure-Floureszenz *in situ* Hybridisierung (PNA FISH) ermöglicht z.B. die Differenzierung von *C. albicans* und anderen *Non-albicans-Candida*-Spezies direkt aus positiven Blutkulturen mit höchster Sensitivität und Spezifität innerhalb von zwei Stunden (Harris und Hata 2013, Lakner 2008, Stone et al. 2013). Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können spezifische Genabschnitte des ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA)-Gens amplifiziert werden (Willinger 2007). Dadurch ist eine schnelle Identifizierung der *Candida*-Spezies auf mikrobiologischer Ebene möglich. Obwohl verschiedene kommerzielle Assays auf dem Markt sind, die eine Detektion von Hefen im Blut erlauben, kommt die PCR noch nicht in der Routinediagnostik zur Anwendung (Ruhnke et al. 2011, Willinger 2007). Die MALDI-TOF MS ist ein Verfahren, das fungale Proteine massenspektrometrisch analysiert (Arvanitis et al. 2014, Gantt et al. 1999). Sie ermöglicht ebenfalls eine schnelle und exakte Differenzierung von Hefen und wird in größeren Labors schon routinemäßig angewendet (Chao et al. 2014, Lima-Neto et al. 2014, Seyfarth et al. 2012).

#### **2.4.1 Chromogene Nährmedien**

Bereits seit 1990 ist ein weites Spektrum an chromogenen Kulturmedien für die Diagnostik von Bakterien und Pilzen kommerziell erhältlich. Chromogene Nährmedien enthalten Enzymsubstrate, die Farbstoffe freisetzen, wenn sie hydrolysiert werden. Ist der zu

testende Erreger mit diesem Enzym ausgestattet, bilden sich auf dem Medium farbige Kolonien, die eine Differenzierung gegenüber anderen Spezies erlauben. Zusätzlich enthält der Agar Substrate, die ein Wachstum unerwünschter Keime hemmen und so die Identifizierung erleichtern. (Perry und Freydière 2007)

Chromogene Nährmedien zur Detektion von Hefen nutzen Substrate der Hexosaminidase, die typischerweise von *C. albicans* und *C. dubliniensis* exprimiert wird, sowie der Phosphatase, die von *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* in unterschiedlicher Intensität gebildet wird (Niimi et al. 2001, Smith et al. 1973). Aktuell ist eine Vielzahl chromogener Medien zur Differenzierung von Hefen kommerziell erhältlich, die unterschiedliche Substrate beinhalten und deshalb verschiedene Färbungen hervorrufen. Alle Nährmedien ermöglichen laut Hersteller eine sichere Identifizierung von *C. albicans*. Andere Subspezies prägen zum Teil ähnliche Färbungen aus und können auf einigen chromogenen Medien mit Hilfe morphologischer Eigenschaften unterschieden werden, was jedoch sehr subjektiv ist und viel Erfahrung benötigt (Perry und Freydière 2007). Beispielhaft dafür ist *C. glabrata*, der nach *C. albicans* einer der häufigsten Erreger von Candidosen ist (Arendrup et al. 2005, Pfaller et al. 2014), jedoch nicht sicher identifiziert werden kann. Einige Studien beschreiben eine Differenzierbarkeit anhand morphologischer Eigenschaften, die aber von anderen Studien nicht bestätigt wird (Freydière 1996, Horvath et al. 2003, Hospenthal et al. 2006, Odds & Davidson 2000). Ein weiterer limitierender Faktor ist die eingeschränkte Unterscheidbarkeit von *C. albicans* und *C. dubliniensis*, die beide Hexosaminidaseaktivität aufweisen (Perry und Freydière 2007).

Insgesamt bieten chromogene Nährmedien verschiedene Vorteile für die Isolation und Differenzierung von Sprosspilzen der Gattung *Candida*. Sie können nicht nur zur Identifizierung sondern auch zur primären Isolierung von *Candida*-Subspezies eingesetzt werden (Ghelardie et al. 2008, Guzel et al. 2011, Willinger und Manafi 1999). Dadurch verkürzt sich die Zeit von der Probenentnahme bis zur Diagnosestellung und ermöglicht einen schnelleren gezielten Therapiebeginn. Zusätzlich erleichtern chromogene Medien die Detektion von Mischkulturen durch farbliche Unterscheidung (Baixench et al. 2006, Beighton et al. 1995, Ozcan et al. 2010).

## **2.5 Therapie von *Candida*-Infektionen und Resistenzentwicklung**

Zur Therapie von *Candida*-Infektionen stehen Vertreter der Substanzklassen der Polyene, Azole, Echinocandine, Pyrimidine und Pyridone zur Verfügung (Hof und Dörries 2009). Bei der Auswahl des Antimykotikums sind Erregerlokalisierung, klinischer Zustand,

Nebenwirkungen, antimykotische Vorbehandlung, das Patientenalter sowie die Erregeridentität und -Resistenz zu beachten (Groll et al. 2011). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die aktuelle Resistenzlage wichtiger *Candida*-Spezies.

Polyene wirken durch Bindung des Ergosterols der Zellmembran mit Veränderung der Membranpermeabilität abhängig von der Wirkstoffkonzentration und Empfindlichkeit des Pilzes fungistatisch oder fungizid (Tietz 2011). Nystatin und Natamycin kommen in der topischen Therapie von mucocutanen Candidosen zum Einsatz (Groll et al. 2011, Tietz 2011). Als systemische Wirkstoffe sind Amphotericin-B-Desoxycholat und Lipidformulierungen von Amphotericin-B zugelassen (Groll et al. 2011). Anwendung finden diese als Alternative zu den Echinocandinen in der Behandlung systemischer Candidosen (Alothman et al. 2014, Groll et al. 2011). Amphotericin-B-Desoxycholat zeigt starke Nebenwirkungen wie infusionsassoziierte Reaktionen, Elektrolytstörungen und Nephrotoxizität und wird deshalb in Deutschland nicht mehr zur Erstlinientherapie systemischer *Candida*-Infektionen eingesetzt (Anaissie et al. 1996, Groll et al. 2011, Ostrosky-Zeichner 2003a). Liposomale Amphotericin-B-Zubereitungen sind weitaus weniger toxisch und weisen eine bessere Verteilung im Körper auf (Hof und Dörries 2009). Alle wichtigen *Candida*-Arten sind sensibel für Amphotericin-B-Derivate (Chen et al. 2014, Groll et al. 2009). Lediglich für *C. lusitaniae* findet sich eine reduzierte Empfindlichkeit (Ostrosky-Zeichner et al. 2003b).

Azole hemmen durch Blockade des Cytochrom-P450-Isoenzym die Synthese des Zellmembranbausteins Ergosterin und haben dadurch eine fungistatische Wirkung (Tietz 2011). Es wird zwischen Imidazolen und den therapeutisch wirksameren Triazolen unterschieden (Hof und Dörries 2009). Die Gruppe der Imidazole umfasst Wirkstoffe wie Clotrimazol, Isoconazol und Ketoconazol, die vor allem in der topischen Behandlung cutaner oder mucocutaner Candidosen zur Anwendung kommen (Groll et al. 2011, Pappas et al. 2009, Tietz 2011). Die Triazole Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol werden hingegen systemisch bei komplizierten mucocutanen Candidosen und bei stabilen Patienten mit invasiver Candidose ohne vorangegangene Azoltherapie eingesetzt (Alothman et al. 2014, Groll et al. 2011, Reinelt et al. 2008, Tietz 2011). Bei der Anwendung systemischer Azole sind vielfältige Interaktionen mit Medikamenten, die über das Cytochrom-P450-System verstoffwechselt werden, zu beachten (z.B. Antiepileptika, Nicht-steroidale Antirheumatika, Sartane, Antikoagulantien). Mit Ausnahme der Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* zeigen alle *Candida*-Arten eine gute Sensibilität für die Triazole

(Chen et al. 2014, Ostrosky-Zeichner et al. 2003b, Pappas et al. 2009). *C. glabrata* weist mit steigender Tendenz Resistenzen vor allem gegen Fluconazol auf und bildet Kreuzresistenzen für andere Azole aus (Kamikawa et al. 2014, Groll et al. 2009). Auch bei *C. parapsilosis* wurden neuerdings in seltenen Fällen Resistenzen gegen Fluconazol und Voriconazol beobachtet (Ostrosky-Zeichner et al. 2003b, Xiao et al. 2014).

Echinocandine hemmen über die Blockade der  $\beta$ -(1,3)-D-Glucansynthase die Synthese von Glucan, einem essenziellen Zellwandbestandteil, und wirken dadurch fungizid (Tietz 2011). Die Vertreter Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin sind in der Behandlung systemischer Candidosen das Mittel der ersten Wahl, vor allem wenn schwere Infektionen vorliegen oder bereits eine Behandlung mit Azolen vorangegangen ist (Alotham et al. 2014, Groll et al. 2011, Pappas et al. 2009, Perlin 2014). Das Nebenwirkungsspektrum der Echinocandine ist gering, lediglich für Caspofungin wird eine Dosisanpassung bei Leberinsuffizienz empfohlen (Pappas et al. 2009). Die meisten *Candida*-Spezies sind hochsensibel für Echinocandine (Perlin 2014). Ausnahmen bilden *C. parapsilosis* und *C. guilliermondii*, die Resistenzen zeigen (Groll et al. 2011, Pfaller et al. 2008, Xiao et al. 2014). Zusätzlich ist in den letzten Jahren eine Zunahme resistenter *C. glabrata*-Stämme zu beobachten (Alexander et al. 2013, Arendrup und Perlin 2014, Perlin 2014, Pfaller et al. 2012). Bei gleichzeitiger Azolresistenz vieler *C. glabrata*-Stämme besteht hier die Gefahr der Entwicklung multiresistenter Erreger (Perlin 2014).

Das Pyrimidin Flucytosin wird nach intrazellulärer Aktivierung als ‚falsche Base‘ in die Zell-RNA eingebaut und verursacht eine fungistatisch wirkende Fehlprogrammierung der Proteinsynthese (Herdegen 2013). Aufgrund einer raschen Resistenzentwicklung sollte Flucytosin in Kombination mit anderen Antimycotika eingesetzt werden (Hahn et al. 2001). Vorzugsweise erfolgt eine gleichzeitige Gabe mit Amphotericin-B, um die synergistische Wirkung der beiden Antimykotika und die Möglichkeit der Dosisreduktion des stark nephrotoxischen Amphotericin-B auszunutzen (Herdegen 2013, Tietz 2011). Trotz schneller Resistenzentwicklung unter der Therapie sind alle wichtigen *Candida*-Arten, mit Ausnahme von *C. africana*, primär sensibel für Flucytosin (Tietz 2011, Xia et al. 2014).

Pyridone, wie Ciclopiroxolamin und Octopirox, besitzen eine fungizide und sporozide Wirkung, die multifaktoriell durch irreversible Bindung an Zellwand, zytoplasmatische Membranen und Mitochondrien vermittelt wird (Seebacher 2001, Tietz 2011). Sie finden

in der Lokalthherapie cutaner und vulvovaginaler Candidosen Anwendung (Hahn et al. 2001, Mendling 2015).

Zusätzlich zur medikamentösen Therapie sollte bei Vorliegen einer positiven Blutkultur umgehend der zentrale Venenkatheter entfernt werden, da dieser immer als infektiöser Fokus anzusehen ist (Groll et al. 2011, Pappas et al. 2009). Bei Organinfektionen ist in den meisten Fällen außerdem eine chirurgische Herdsanierung erforderlich (Groll et al. 2011).

<i>Candida spp.</i>	AMB	FC	FCZ	ITZ	VCZ	PCZ	ANID	CAS	MICA
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S/I	S	I/R	S/I/R	S/I/R	S/I/R	S*	S*	S*
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S/I	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S*	S	S	S	I	I	I
<i>C. krusei</i>	S/I	R	R	I/R	S/I/R	S/I/R	S	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	R
<i>C. lusitaniae</i>	S/I/R	S	S	S	S	S	S	S	S

**Tabelle 2.2** Empfindlichkeit einzelner *Candida*-Spezies gegenüber systemischen Antmykotika (AMB: Amphotericin-B-Derivate, FC: Flucytosin, FCZ: Fluconazol, ITZ: Itraconazol, VCZ: Voriconazol, PCZ: Posaconazol, ANID: Anidulafungin, CAS: Caspofungin, MICA: Micafungin, S: sensibel, I: intermediär sensibel, R: resistent, \* zunehmende Resistenzen) (Chen et al. 2014, Groll et al. 2011, Ostrosky-Zeichner et al. 2003b, Pappas et al. 2009)

### 3 Zielstellung

*Candida*-Infektionen spielen im klinischen Alltag eine zunehmende Rolle. Sie verursachen nicht nur lokale Infektionen, die in der ambulanten und stationären Praxis von Bedeutung sind, sondern auch invasive Mykosen, die vor allem auf chirurgischen Stationen und Intensivstationen vorkommen und mit hohen Mortalitätsraten einhergehen. Die Prognose systemischer Candidosen ist entscheidend von einem frühzeitigen, zielgerichteten Therapiebeginn abhängig. Auch in Anbetracht der steigenden antimykotischen Resistenzen vieler Subspezies, kommt der mikrobiologischen Diagnostik eine entscheidende Bedeutung zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, chromogene Nährmedien verschiedener Hersteller bezüglich ihrer Fähigkeit zur Anzucht und Differenzierung häufig vorkommender Erreger von *Candida*-Infektionen sowie der Spezies *C. africana* zu testen und zu vergleichen. Dafür wurden zunächst Inkubationsbedingungen ermittelt, die eine schnelle und eindeutige Identifizierung der Farbunterschiede erlauben. Anschließend sollte die Differenzierbarkeit der *Candida*-Spezies auf den chromogenen Nährmedien evaluiert werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war der Vergleich der konventionellen Methoden Anzucht auf Reisagar, biochemische Identifikation und Anzucht auf chromogenen Nährmedien sowie der neueren Methoden PCR und Sequenzierung sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie hinsichtlich der Differenzierbarkeit von *Candida*-Spezies.

Insgesamt zielt diese Arbeit auf eine Verbesserung der mykologischen Diagnostik sowohl lokaler als auch systemischer Candidosen hin und soll zu einer sicheren Erkennung mit nachfolgend adäquater Therapie von *Candida*-Infektionen beitragen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Pilzstämmen und Pilzanzucht

Die Untersuchungen wurden an 107 Hefepilzstämmen der Spezies *Candida* durchgeführt. Davon stammen 87 Proben aus Pilzkulturen der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena, die aus Patientenmaterial isoliert wurden. Fünf Stämme der Subspezies *C. africana* stellte Prof. Dr. med. habil. H.-J. Tietz, Leiter des Instituts für Pilzkrankheiten und Mikrobiologie in Berlin, zur Verfügung. Weitere 15 Stämme sind Referenz- und Ringversuchsstämme (siehe Tabelle 4.1). Für die Testung der chromogenen Nährmedien wurden ausschließlich die in Tabelle 4.1 aufgeführten Subspezies verwendet.

<i>Candida spp.</i>	Referenzstamm-Nummern	Gesamtzahl
<i>C. africana</i>	RV 01/05 ATTC MYA2669	7
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231 ATCC 64550 ATCC 76615 DSM 11225	32
<i>C. dubliniensis</i>	DSM 13268	22
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001 DSM 11226	6
<i>C. guilliermondii</i>	DSM 6381 DSM 11947	7
<i>C. krusei</i>	DSM 6128	5
<i>C. parapsilosis</i>	RV II/08 DSM 11224	17
<i>C. tropicalis</i>	DSM 11953	5

**Tabelle 4.1** Referenznummern der Referenz- und Ringversuchsstämme sowie Gesamtzahl der in die Testung der chromogenen Nährmedien eingeschlossenen *Candida*-Spezies

Die 87 Proben aus Pilzkulturen der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena sowie die fünf *Candida*-Stämme, die Prof. Dr. med. habil. H.-J. Tietz zur Verfügung stellte, wurden aus Abstrichen bzw. Schuppen von unterschiedlichen Körperregionen gewonnen.

Die Lagerung der Hefestämme erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Mikrobankgefäßen. Zur Anzucht wurden unter aseptischen Bedingungen in der Laminarbox aus dem entsprechenden Mikrobankgefäß zwei Kügelchen mit Hilfe einer sterilen Öse entnommen und auf einer



Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 (SGC2) -Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde bei 30°C für ca. 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Überimpfung der *Candida*-Kulturen auf die chromogenen Nährmedien. Für die Identifizierung mit Hilfe des ID32 C-Systems, des Reisagars, der MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) und der Sequenzierung wurden die beimpften SGC2-Platten für vier Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

## 4.2 Identifizierung der Pilzstämmе

Zur eindeutigen Identifizierung wurden die *Candida*-Stämme auf SGC2-Agar angezüchtet (siehe Kapitel 4.1) und mit dem ID32 C-System getestet. Bei unklaren Ergebnissen wurde die Auswertung wiederholt und der Pilz auf Reisagar kultiviert und mikroskopisch beurteilt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der 87 Proben aus Pilzkulturen der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena, der fünf *Candida*-Stämme, die Prof. Dr. med. habil. H.-J. Tietz zur Verfügung stellte, und der zwei *C. africana*-Referenz- bzw. Ringversuchsstämme mit der MALDI-TOF MS und Sequenzierung. Die Referenz- und Ringversuchsstämme der Subspezies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* wurden nicht noch einmal überprüft, da die Auswertung der Resultate des ID32 C-Systems und Reisagars mit den Referenzangaben übereinstimmte. Alle Hefen, die unklare oder inkongruente Ergebnisse aufwiesen, wurden nicht für die Untersuchungen verwendet. Es konnten 101 Stämme ermittelt werden, die als richtig positive Proben in die Testreihe eingeschlossen wurden.

### 4.2.1 ID32 C-System

Das ID32 C-System (Firma bioMérieux) dient der biochemischen Identifizierung von Hefen. Sein Prinzip beruht auf der Detektion unterschiedlicher Assimilationsmuster von Kohlenhydraten. Der ID32 C-Teststreifen enthält 32 verschiedene Kohlenhydrate, die in dehydrierter Form in Vertiefungen eingebracht sind. Die zu testende Hefe wird in einem halbfesten Medium suspendiert und in die Vertiefungen pipettiert. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubation zeigt sich in den Vertiefungen, abhängig vom Assimilationsmuster, ein Wachstum des Pilzes, das als weißliche Trübung sichtbar ist. Die Ergebnisse werden mit Hilfe einer Identifizierungssoftware, die auf eine Referenzdatenbank zurückgreift, ausgewertet.

Die Durchführung erfolgte gemäß der Arbeitsanleitung ID32 C (bioMérieux 2006). Von dem zu testenden *Candida*-Stamm wurde eine Suspension mit dem API-

Suspensionsmedium 2mL mit einer Trübung Mc-Farland 2 am Densimat eingestellt. Davon wurden 250µL in die Ampulle API C-Medium gegeben. Mit der elektronischen ATB-Pipette erfolgte die Mischung des API C-Mediums mit der *Candida*-Suspension und anschließend die Beimpfung des ID32 C-Streifens. Dabei wurden in jede Vertiefung 135µL eingebracht. Nach Auflegen des Deckels wurde der Streifen für 48 Stunden bei 30°C bebrütet. Die Ablesung erfolgte zunächst maschinell mit dem System Mini-API. Wenn kein eindeutiges Ergebnis erkennbar war, wurde noch einmal visuell abgelesen.

#### 4.2.2 Anzucht auf Reisagar



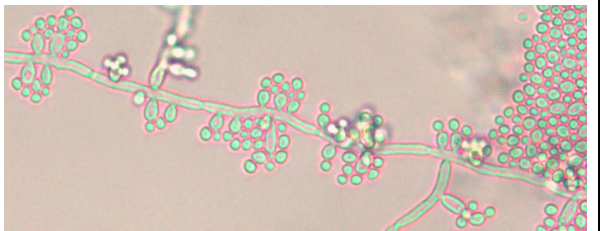
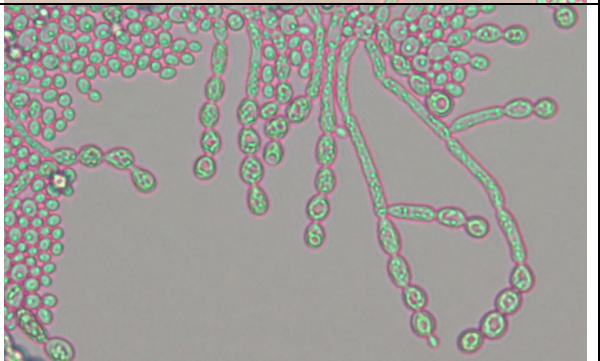
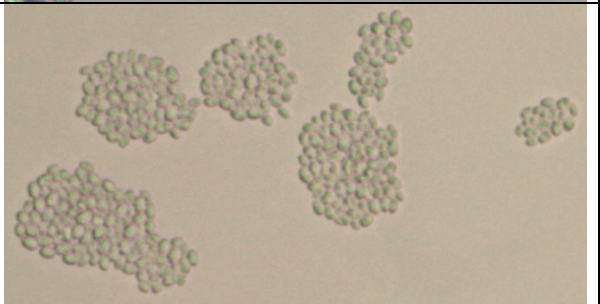
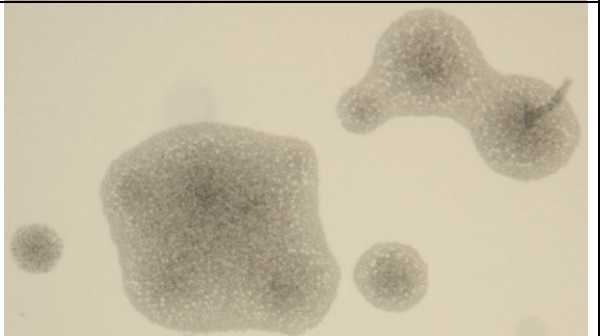
Reisagar ist ein Testnährboden zur Differenzierung von Hefen, insbesondere von *C. albicans* und anderen *Candida*-Spezies. Das Medium enthält als einzige Nährstoffquelle Reisextrakt. Durch das zusätzliche Auflegen eines Deckglases auf die beimpfte Stelle entstehen nährstoffarme, halbanaerobe Wachstumsbedingungen, unter denen Hefen verstärkt Myzel, Pseudomyzel, Chlamydosporen und Arthrosporen ausbilden. Nach 24- bis 48-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur können die Kulturen mikroskopisch beurteilt werden. Dabei weisen die verschiedenen *Candida*-Spezies morphologisch charakteristische Eigenschaften auf, die in Tabelle 4.3 dargestellt werden. (Kozłowska 1995, Rieth 1995, Seebacher und Blaschke-Hellmessen 1990)

Für die Untersuchungen wurden Reisagarplatten der Firma heipha verwendet. Der Agar setzt sich wie in Tabelle 4.2 aufgeführt zusammen.

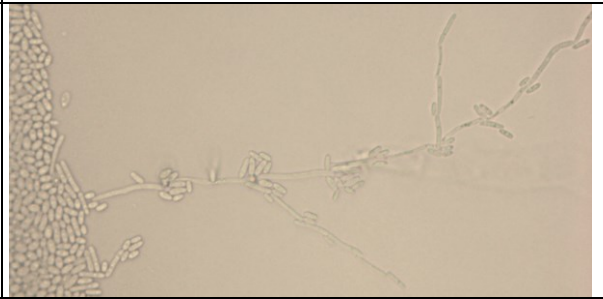
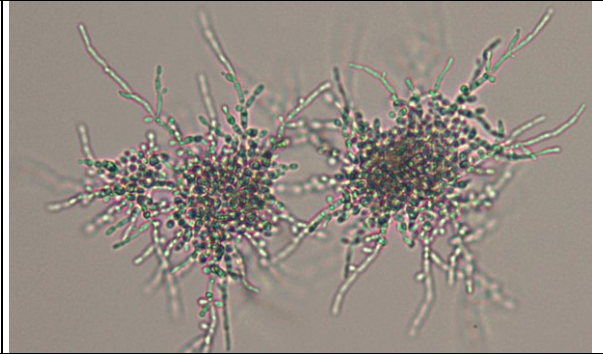

Reagenz	Menge pro l
Reisextrakt	5,0g
Tween 80	10mL
Agar	15,0g

**Tabelle 4.2** Zusammensetzung Reisagar heipha

Die Durchführung erfolgte gemäß der Produktbeschreibung Reisagar (heipha). Es wurde eine kleine Öse der SGC2-Kultur des zu testenden Stammes auf den Reisagar übertragen und in drei bis vier Zickzack-Linien ausgestrichen. Der beimpfte Bereich wurde mit zwei Deckgläsern abgedeckt und die Agarplatte bei Zimmertemperatur für 24 bis 48 Stunden aufbewahrt, bevor sie mikroskopisch beurteilt wurde.

<i>Candida</i> spp.: Morphologische Eigenschaften	Beispiel
<i>C. africana</i> : - Pseudomyzel - ovale Blastosporen - keine Chlamydosporen	
<i>C. albicans</i> : - reichlich langes Pseudomyzel - traubenförmig angeordnete, kugelförmige und ovale Blastosporen - dunkle, dickwandige, kugelförmige, meist terminale Chlamydosporen, die einer leicht geschwollenen Zelle aufsitzen	 
<i>C. dubliniensis</i> : - reichlich kurzes Pseudomyzel - traubenförmig angeordnete Blastosporen - dunkle, dickwandige, kugelförmige, meist terminale Chlamydosporen in trauben- oder kettenförmiger Anordnung von 1-3 Chlamydosporen	
<i>C. glabrata</i> : - kein Pseudomyzel - kleine, in Häufchen angeordnete Blastosporen - keine Chlamydosporen	
<i>C. guilliermondii</i> : - spärliches oder kein Pseudomyzel, ausstrahlend vom Blastosporenhäufchen - sehr kleine, in spiegeleiartigen Koloniehäufchen angeordnete Blastosporen - keine Chlamydosporen	

**Tabelle 4.3** Morphologische Eigenschaften von *Candida*-Spezies auf Reisagar (de Hoog et al. 2000, Tietz und Ulbicht 1999, Hipler und Rahmig) (Fortsetzung auf Seite 22)

<i>Candida</i> spp.: Morphologische Eigenschaften	Beispiel
<i>C. krusei</i> : - langgestrecktes Pseudomyzel (kann fehlen) - sehr große, ovale Blastosporen - keine Chlamydosporen	
<i>C. parapsilosis</i> : - baumartig verzweigtes, sternförmig um ein Blastosporenhäufchen angeordnetes Pseudomyzel - ovale, rosettenförmig angeordnete Blastosporen - keine Chlamydosporen	
<i>C. tropicalis</i> : - reichhaltig langgestrecktes, zum Teil stark verzweigtes Pseudomyzel - traubenförmig angeordnete Blastosporen - keine Chlamydosporen	

**Tabelle 4.3** Morphologische Eigenschaften von *Candida*-Spezies auf Reisagar (de Hoog et al. 2000, Tietz und Ulbicht 1999, Hipler und Rahmig) (Fortsetzung von Seite 21)

#### 4.2.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF MS ist ein Verfahren zur Massenanalyse, das zur schnellen Identifizierung von Hefen und Bakterien eingesetzt wird (Gantt et al. 1999, Seyfarth et al. 2012). Es basiert auf einer Kombination aus Matrix-unterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI) und Flugzeitanalyse (time of flight, TOF).

MALDI ist eine massenspektrometrische Ionisierungstechnik, bei der das zu testende Material zunächst mit einer flüssigen Matrix vermischt wird. Die Lösung wird dann auf ein metallisches Target übertragen und es kommt zur Kokristallisation von Analyt und Matrix. Die feste Probenmatrix wird mit gepulster Laserstrahlung beschossen, wobei meist UV-Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337nm, zunehmend aber auch Infrarot-Laser, zum Einsatz kommen. Dadurch wird die Matrix schlagartig desorbiert und reißt dabei die Analytenmoleküle mit. Gleichzeitig kommt es zur Ionisierung der Analytenmoleküle. Die Ionen werden im elektrischen Feld von der Ionenquelle in Richtung Ionendetektor

beschleunigt. (Lehmann 1996, Fenselau et al. 2011) Bei der TOF-Massenspektrometrie wird die Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor gemessen. Voraussetzung ist ein diskontinuierlicher, gepulster Ionenstrahl. Die TOF-Messung beruht auf dem Prinzip, dass schwerere Ionen bei gleicher Ladung und gleicher Potenzialdifferenz langsamer fliegen als leichtere. Die Flugzeit ist dabei proportional zur Wurzel des Quotienten aus Masse und Ladungszahl (siehe Formel 4.1).

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

tof - Flugzeit  
m - Masse  
z - Ladungszahl

**Formel 4.1** Zusammenhang zwischen Flugzeit und Masse in der MALDI-TOF MS

Für unterschiedliche Biomoleküle ergeben sich dadurch spezifische Verteilungsmuster der m/z-Werte, die in einer Tabelle gegen die relative Häufigkeit bzw. Intensität aufgetragen werden (Lehmann 1996). Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3 zeigen beispielhaft die MALDI-TOF-Massenspektren verschiedener, im Rahmen dieser Studie getesteter *Candida*-Spezies. Die Auswertung und Identifizierung erfolgt mit Hilfe einer speziellen Software durch Vergleich mit einer Datenbank, in der mehrere Spektren verschiedener Spezies hinterlegt sind (Seyfarth 2012).

Die MALDI-TOF-Messungen für diese Untersuchung wurden vom Ripac-Labor, Potsdam-Golm übernommen. Die Messungen erfolgten mit dem Axima Confidence-Massenspektrometer (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany), das mit Hilfe eines 50 Hz-UV-Stickstoff-Lasers (Wellenlänge von 337nm) die Proben ionisiert. Das Massenspektrum einer Probe wurde aus 500 Laserpuls-Zyklen ermittelt und mit der BioTech-Launchpad-Software (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) verarbeitet. Dabei wurde jede Messung zweimal durchgeführt. Zur mikrobiellen Identifizierung wurden die Daten anschließend in die SARAMIS-Software (AnagnosTec) eingegeben und ausgewertet.

#### 4.2.4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden zeigen vielversprechende Ergebnisse in der raschen Identifizierung und Differenzierung von Pilzkulturen. Dabei ist vor allem die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), die der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen durch eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation dient, von großer Bedeutung. Im Anschluss an die Amplifizierung wird der Pilz mittels

Hybridisierungs-sonden oder Sequenzierung identifiziert (Verweij und Meis 2000, Willinger 2007, Rassow et al. 2008).

Im ersten Schritt erfolgt die Extraktion der DNA des zu untersuchenden Pilzstammes. Um an die DNA zu gelangen, ist zunächst der Aufschluss der Zelle nötig. Das erfolgt mit Hilfe enzymatischer oder mechanischer Zerkleinerungsschritte. Für die Extraktion der DNA stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Für diese Untersuchungen wurde eine Zwei-Phasen-Extraktion mit nachfolgender Isopropanolfällung genutzt. Durch Zugabe bestimmter Reagenzien und Zentrifugation kommt es zu einer Auftrennung der Probe in zwei Phasen. In der oberen, wässrigen Phase findet sich die RNA. Nach mehrfacher Wiederholung des Trennungsvorganges der wässrigen Phase kann die RNA mithilfe einer Isopropanol- oder Ethanol-Fällung gewonnen werden. Im Anschluss werden bestimmte, speziesspezifische Sequenzen der extrahierten DNA mittels PCR vervielfältigt. Typische Targets sind 18S rRNA-Gene, 28S rRNA-Gene, mitochondriale Gene sowie die internal transcribed spacer 1 (ITS 1)- und 2 (ITS 2)-Region. Für den Nachweis und die Identifizierung von *Candida*-Spezies zeigen sich die ITS 1- und ITS 2-Regionen, die die 18S-, 5,8S- und 28S rRNA-Gene flankieren, als sehr aussagekräftige Zielsequenzen (Willinger 2007, Schabereiter-Gurtner et al. 2007, Selvarangan et al. 2003). Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen, die als Zyklus bezeichnet werden. Im ersten Schritt kommt es durch Erhitzen auf ca. 95°C zur Denaturierung und somit zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge. Im zweiten Schritt werden zwei Primer, Oligodesoxyribonukleoside, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, hinzugegeben und lagern sich an die komplementären Bereiche des DNA-Einzelstranges an (Hybridisierung). Der dritte Schritt umfasst die Synthese der zu vervielfältigenden Zielsequenz. Durch Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und freier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) werden die Primer an ihrem freien 3'-OH-Ende durch die DNA-Polymerase verlängert, sodass nach Abschluss eines Zyklus im Optimalfall eine Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz vorliegt. Ein PCR-Prozess umfasst in der Regel 20-40 Zyklen (Rassow et al. 2008). Die Identifizierung des Pilzstammes kann mittels Hybridisierung oder Sequenzierung erfolgen. Für diese Untersuchungen wurde die Sequenzierung mithilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger gewählt. Dabei wird dem zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA-Abschnitt ein markierter Oligonukleotid-Primer hinzugefügt. Der hybridisierten DNA werden in vier parallelen Ansätzen DNA-Polymerase, freie Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und in geringer Konzentration Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben. Jeder der

vier Ansätze enthält ddNTPs mit einer anderen Base (Didesoxyadenintriphosphat, Didesoxyguanintriphosphat, Didesoxycytosintriphosphat, Didesoxythymintriphosphat). Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-OH-Ende des Primers die Synthese eines komplementären DNA-Strangs durch Einbau von dNTPs. Erfolgt der Einbau eines ddNTPs kommt es an dieser Stelle zum Abbruch der Kette, da das ddNTP am 3'-Kohlenstoffrest ebenfalls desoxygeniert ist (3'-H) und die DNA-Polymerase zum Ausbilden einer Phosphodiesterbindung eine Hydroxylfunktion (-OH) benötigt. Weil die dNTPs mit den ddNTPs konkurrieren, kommt es im Laufe der Zeit an allen Stellen, an denen eine entsprechende Nucleobase benötigt wird, nach dem Zufallsprinzip zum Kettenabbruch. Dadurch entstehen Syntheseprodukte verschiedener Längen, die mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt werden. Anhand des Bandenmusters der vier Ansätze kann nun die Basenfolge abgelesen werden, da die Länge eines Fragments die Position der jeweiligen Base in der Basensequenz widerspiegelt (Rassow et al. 2008, Thieman und Palladino 2007).

Die DNA-Extraktion und Amplifizierung der ITS-Region erfolgte durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Berlin. Die Sequenzierung wurde von der Firma SMB-Services in Molecular Biology GmbH übernommen. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Verhältnis 25/24/1) und anschließender Isopropanolfällung entsprechend der Arbeitsanweisung. Die Amplifizierung der ITS-Region wurde mit dem Primerpaar LSU 266 und V9G am Thermocycler in 35-40 Zyklen durchgeführt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte mithilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger mit den inneren Primern ITS4 und ITS5. Zur Identifizierung der Spezies wurden die ermittelten ITS-Sequenzen mit Referenzsequenzen der Datenbank SmartGene Fungal IDNS (SmartGene GmbH, Zug, Schweiz) verglichen (Blast Search).

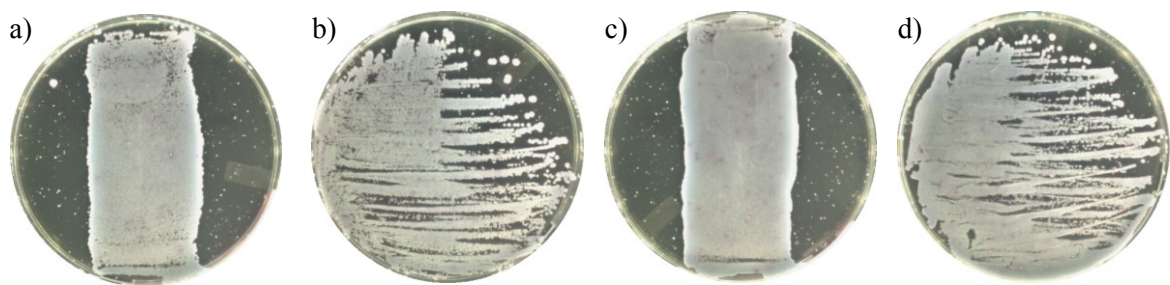
#### 4.3 Vorversuche

Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen wurden im Vorfeld der Untersuchungen Testversuche durchgeführt. Dabei erfolgte die Festlegung der Mc Farland-Trübung und Inoculummenge (Keimzahlbestimmung), der Ausstrichtechnik und der Bebrütungstemperatur.

Es wurden je ein *C. africana*-, *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stamm auf SGC2-Agar angezüchtet und anschließend von jedem Stamm Suspensionen mit einer Trübung Mc



Farland 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 hergestellt. Die Einstellung der Mc Farland-Trübung erfolgte, wie vom Hersteller angegeben, am Densimat (bioMérieux) durch schrittweises Einbringen der Pilzkultur in das API-Suspensionsmedium 2mL mithilfe einer sterilen Öse bis die gewünschte Mc Farland-Trübung erreicht war. Je 100µL der Suspension wurden auf CandiSelect 4-Agarplatten pipettiert und mit einem Spatel in einer geraden Bahn über die Platte ausgestrichen. In einem zweiten Ansatz erfolgte die Beimpfung mit einer Öse als S-förmiger Impfstrich. Der Versuch wurde für alle drei Stämme und Mc Farland-Trübungen durchgeführt. Die *Candida*-Kulturen wurden anschließend bei 30°C inkubiert und nach 24 und 48 Stunden kontrolliert. Das Ergebnis wurde schriftlich und fotografisch dokumentiert (siehe Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1** *C. dubliniensis* nach 48-stündiger Inkubation: Mc Farland 0,5-Suspension mit a) Spatelausstrich und b) Ösenausstrich sowie Mc Farland 2,0-Suspension mit c) Spatelausstrich und d) Ösenausstrich

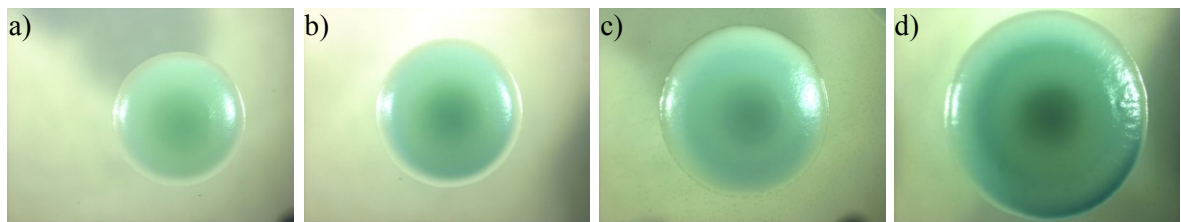
Dieser Vorversuch zeigte, dass eine Inoculummenge von 100µL zu groß war. Es konnten kaum Einzelkolonien unterschieden werden und die Differenzierung der Mc Farland-Trübungen war nur eingeschränkt möglich.

Im folgenden Versuch wurde ausschließlich mit dem *C. dubliniensis*-Stamm gearbeitet, da alle drei *Candida*-Spezies im ersten Test ähnliche Wachstumseigenschaften aufwiesen. Im vorangegangenen Versuch zeigte sich, dass die Keimzahl bei einer Trübung von Mc Farland 2,0 und einer Inoculummenge von 100µL zu groß war, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Deshalb wurden nun Mc Farland-Trübungen von 0,5 und 1,5 am Densimat eingestellt und Inoculummengen von 25µL und 50µL gewählt. Die Ausstrich-techniken mit Spatel und Öse sowie die Bebrütungstemperatur und -Zeit wurden beibehalten. In diesem Versuch konnte eine für die nachfolgenden Untersuchungen einsetzbare Inoculummenge von 25µL und eine Mc Farland-Einstellung von 1,0 ermittelt werden. Das Ausstreichen mit der Öse lieferte deutlichere Ergebnisse als mit dem Spatel.

Ein weiterer Vorversuch beschäftigte sich mit der Ausstrichtechnik und Bebrütungstemperatur, da die Hersteller der chromogenen Medien unterschiedliche



Optimaltemperaturen von 30°C bis 37°C für die Anzucht der Hefen angeben. Es wurden 25µL einer Suspension des *C. albicans*-Stammes mit einer Trübung Mc Farland 1,0 auf die chromogenen Nährmedien MAST ID - CHROMagar Candida, BBL CHROMagar Candida, chromID Candida Agar, CandiSelect 4, Candida-Ident-Agar und Brilliance Candida aufgetragen. Das Ausstreichen mit der Öse erfolgte als S-förmiger Impfstrich und in einem weiteren Versuchsansatz als Verdünnungsimpfstrich. Die Kulturen wurden jeweils doppelt angesetzt, sodass eine separate Bebrütung bei 30°C und 37°C möglich war. In Abhängigkeit von der Ausstrichtechnik fanden sich deutliche Unterschiede im Wachstumsmuster. Der Verdünnungsimpfstrich erlaubte die Differenzierung einzelner Kolonien und wurde deshalb für die nachfolgenden Untersuchungen gewählt. Beim S-förmigen Impfstrich bildete sich ein durchgehender Pilzrasen aus. Außerdem zeigte sich, dass sich *C. albicans* bei einer Bebrütungstemperatur von 30°C schwächer vermehrte und weniger intensive Farben ausprägte (siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2** *C. albicans*-Kolonie im Verdünnungsimpfstrich auf BBL CHROMagar nach 48 Stunden bei a) 30°C und b) 37°C sowie nach 72 Stunden bei c) 30°C und d) 37°C

In den Vorversuchen konnten als beste Versuchsbedingungen ein Trübungsgrad Mc Farland 1, eine Inoculummenge von 25µL, das Ausstreichen mit dem Verdünnungsimpfstrich und eine Bebrütungstemperatur von 37°C ermittelt werden.

#### 4.4 Anzucht auf chromogenen Medien

Für die Anzucht der 101 Candidastämme auf den chromogenen Medien MAST ID - CHROMagar Candida, BBL CHROMagar Candida, chromID Candida, CandiSelect 4, Candida-Ident-Agar und Brilliance Candida wurde eine Suspension der auf SGC2-Agar gezüchteten Pilzkultur mit dem Trübungsgrad Mc Farland 1 hergestellt. Mithilfe einer Pipette wurden je 25µL der Suspension auf die chromogenen Medien transferiert und im Verdünnungsimpfstrich mit einer sterilen Öse ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 72 Stunden.

##### 4.4.1 MAST ID - CHROMagar Candida

MAST ID - CHROMagar Candida entspricht CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, Frankreich), der von der Firma Mast unter geändertem Namen vertrieben wird. Er dient

laut Hersteller dem Nachweis und der Identifizierung von *C. albicans*, *C. tropicalis* und anderen *Candida*-Spezies. Das Auslesen der Ergebnisse erfolgt nach 24- bis 48-stündiger Inkubation bei 37°C. *C. albicans* wächst in grünen, *C. tropicalis* in blauen Farben. Andere Subspezies präsentieren sich weiß bis rosa. Die Farbunterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Tabelle 4.4 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Peptongemisch	10,0g
Chromogener Mix	22,0g
Chloramphenicol	0,5g
Agar	15,0g

**Tabelle 4.4** Zusammensetzung MAST ID - CHROMagar Candida

#### 4.4.2 BBL CHROMagar Candida

Der BBL CHROMagar Candida ist ein chromogenes Nährmedium, das basierend auf dem CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, Frankreich) von der Firma Beckton, Dickinson and Company (BD) nach neuem Rezept produziert wird. Er erlaubt laut Hersteller die direkte Differenzierung von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. krusei* nach 36- bis 48-stündiger Inkubation bei  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . *C. albicans* bildet hell- bis mittelgrüne und *C. tropicalis* dunkel- bis metallicblaue Farben aus. *C. krusei* wächst in hell- bis mittellilafarbenen Kolonien mit weißem Rand. Andere Subspezies wie z.B. *C. glabrata* prägen hell- bis dunkellilafarbene Schattierungen aus. Die Farbunterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Tabelle 4.5 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Chromopepton	10,0g
Glucose	20,0g
Chromogene Mischung	2,0g
Chloramphenicol	0,5g
Agar	15.0g

**Tabelle 4.5** Zusammensetzung BBL CHROMagar Candida

#### 4.4.3 chromID Candida

Zur Identifizierung von *C. albicans* und zur vorläufigen Differenzierung der Subspezies *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* und *C. kefyr* stellt die Firma bioMérieux das chromogene Medium chromID Candida her. Die Ergebnisse können nach einer 24- bis 72-stündigen Inkubation bei 37°C abgelesen werden. Für *C. albicans* sind dabei hell- bis dunkelblaue Kolonien typisch. *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* und *C. kefyr* erscheinen rosa und müssen laut

Hersteller zur eindeutigen Identifizierung nachfolgend biochemisch und/oder immunologisch getestet werden. Die Farbunterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Es wird darauf hingewiesen, dass auf chromID Candida Agar keine Differenzierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* möglich ist (Fricker-Hidalgo et al. 2001). Tabelle 4.5 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Hefeextrakt	6,0g
Malzextrakt	4,5g
Substrate und Enzymregulatoren	1,71g
Agar	14,0g
Antibiotikamischung	0,107g

**Tabelle 4.6** Zusammensetzung chromID Candida

#### 4.4.4 CandiSelect 4

CandiSelect 4 der Firma BioRad ermöglicht laut Hersteller, *C. albicans* direkt und *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* mutmaßlich zu identifizieren. Aussagekräftige Ergebnisse werden bei einer Inkubation bei 35 bis 37°C über 24 bis 48 Stunden erreicht. *C. albicans* entwickelt aufgrund seiner Hexosaminidaseaktivität eine rosa bis lila Farbe. Türkise Schattierungen weisen auf eine Phosphataseaktivität hin und werden von *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* in unterschiedlicher Intensität gebildet. Eine vorläufige Differenzierung ist mithilfe der Morphologie möglich. *C. tropicalis* zeigt intensiv türkise, sphärische, glatt umrandete Kolonien und *C. glabrata* bildet helltürkise, flache, glänzende Kolonien mit glatter Umrandung aus. *C. krusei* präsentiert sich türkisblau mit rauem, trockenem Erscheinungsbild und unregelmäßigem Rand. Die Farb- und morphologischen Unterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Der Hersteller merkt an, dass *C. dubliniensis* das gleiche Rosa bzw. Lila ausprägt wie *C. albicans*. Tabelle 4.7 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Peptonmischung	8,0g
Glucose	5,0g
Chromogene Substrate	0,2g
Chloramphenicol + Gentamicin	0,5g
Agar	13,0g

**Tabelle 4.7** Zusammensetzung CandiSelect 4

#### 4.4.5 Candida-Ident-Agar

Der Candida-Ident-Agar der Firma heipha dient der Isolierung und direkten Identifizierung von *C. albicans*. Die Anzucht erfolgt optimal bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  für 24 bis 48 Stunden. *C. albicans* bildet dabei im Gegensatz zu den meisten anderen Hefen grüne bis blaugrüne Kolonien aus. Weitere *Candida*-Subspezies wachsen als weiße bis beige Kolonien. Es wird darauf hingewiesen, dass einige *C. tropicalis*-Stämme ebenfalls grün erscheinen können. Die Farbunterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Tabelle 4.8 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Pepton	5,0g
Hefeextrakt	3,0g
Malzextrakt	3,0g
Glucose	10,0g
Chloramphenicol	0,05g
Gentamicin	0,1g
Chromogene Mischung	2,6g
Agar	18,0g

**Tabelle 4.8** Zusammensetzung Candida-Ident-Agar

#### 4.4.6 Brilliance Candida

Brilliance Candida der Firma Oxoid ermöglicht laut Hersteller die Differenzierung von *C. albicans*, *C. tropicalis* und anderen *Candida*-Spezies. Optimale Ergebnisse zeigen sich bei einer Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$  über 24 bis 72 Stunden. *C. albicans* und *C. dubliniensis* zeigen grüne Färbungen. *C. tropicalis* prägt dunkelblaue und *C. krusei* rosa- bis braune Kolonien aus. Alle anderen Subspezies entwickeln beige, gelbe oder braune Schattierungen. Die Farbunterschiede sind in Tabelle 4.10 aufgelistet. Tabelle 4.9 zeigt die Zusammensetzung des chromogenen Mediums. Die chromogenen Substrate sind X-NAG (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl N acetyl  $\beta$ -D-glucosaminid), das von der Hexosaminidase der Subspezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* abgebaut wird, und BCIP (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl phosphat p-toluidin salz), das dem Nachweis der alkalischen Phosphatase von *C. krusei* und anderen *Candida*-Spezies dient.

<b>Zusammensetzung pro 1l gereinigtes Wasser</b>	
Pepton	4,0g
Chromogene Mischung	13,6g
Agar	13,6g

**Tabelle 4.9** Zusammensetzung Brilliance Candida

Zusammenfassend sind in Tabelle 4.10 die laut Herstellerangaben zu erwartenden Farbausprägungen der *Candida*-Spezies auf den sechs chromogenen Medien dargestellt.

<i>Candida spp.</i>	<b>MAST ID - CHROMagar Candida</b>	<b>BBL CHROMagar Candida</b>	<b>chromID Candida</b>	<b>Candi Select 4</b>	<b>Candida- Ident-Agar</b>	<b>Brilliance Candida</b>
<i>C. albicans</i>	grün	hell- bis mittelgrün	hell- bis dunkelblau	rosa bis lila	grün bis blaugrün	grün
<i>C. dubliniensis</i>	-	-	-	rosa bis lila	-	grün
<i>C. glabrata</i>	weiß bis rosa	mittel- bis dunkellila	-	helltürkis (glänzend, glatt)		beige/gelb/ braun
<i>C. krusei</i>	weiß bis rosa	hell- bis mittellila	weiß mit charakteris- tischem Aussehen	türkisblau (rau, unregelmäßig er Rand)		rosa-braun (rau, un- regelmäßiger Rand)
<i>C. parapsilosis</i>	weiß bis rosa	-	-	-	-	beige/gelb/ braun
<i>C. tropicalis</i>	blau	dunkel- bis metallischblau	rosa	Intensiv türkis (sphärisch, glatt)	weiß oder grün mit hellem Rand	dunkelblau
<i>C. kefyr</i>	weiß bis rosa	-	rosa	-		beige/gelb/ braun
<i>C. lusitaniae</i>	weiß bis rosa	-	rosa	-		beige/gelb/ braun

**Tabelle 4.10** Farbausprägung der *Candida*-Spezies auf chromogenen Medien (Herstellerangaben)

#### 4.5 Fotografie: Stereomikroskop und AxioCam

Die auf den chromogenen Medien angezüchteten *Candida*-Stämme wurden nach 24, 48 und 72 Stunden unter dem Stereomikroskop STEMI 2000-CS (Zeiss) betrachtet und mithilfe der an das Gerät angeschlossenen Kamera AxioCam ICc1 (Zeiss) fotografiert. Die Bildverarbeitung am Computer erfolgte mit dem Programm AxioVision Release 4.7.1. (Zeiss). Im Vorfeld wurden die besten Fotografiebedingungen durch probatorisches Vorgehen ermittelt. Dafür wurden die beweglichen Lichtquellen, CL 1500 ECO (Zeiss),

optimal ausgerichtet und die in Tabelle 4.11 aufgeführten Kameraeinstellungen gewählt. Während der gesamten Untersuchung wurden diese Einstellungen nicht geändert.

Das Scharfstellen des mikroskopischen Bildes erfolgte separat für jedes Foto. Aufgrund der Beleuchtung mit den mikroskopeigenen, flexiblen Lampen konnte die Kamera AxioCam Icc1 unabhängig vom einfallenden Tageslicht verwendet werden.

Kameraattribut	Eingestellter Wert
Belichtung	6,0ms, 100 %
Weißabgleich:	
Cyan - Red	0,59
Magenta - Green	0,00
Yellow - Blue	0,29
Farbsättigung	1,0
Gain-Faktor	0,0
Helligkeit	-0,5
Kontrast	1,0
Gamma-Wert	1,0

**Tabelle 4.11** Kameraeinstellungen der AxioCam Icc1

#### 4.6 Farbbestimmung: Pantone Matching System

Zusätzlich zur Fotodokumentation erfolgte durch visuellen Vergleich mit Referenzfarben die Bestimmung der Koloniefärbung. Dafür wurde das Pantone Matching System ‚Pantone PLUS Formula Guide-Solid Uncoated‘, das 1677 Farben umfasst, verwendet.

#### 4.7 Statistische Auswertung

Die visuell ermittelten Pantone-Farbwerte (Zahlencodes) wurden dokumentiert und zusammenfassend den entsprechenden Farbschattierungen zugeordnet. Tabelle 4.13 zeigt die Zuordnung der Farbcodes.

Die statistische Auswertung wurde mithilfe binärer diagnostischer Tests durchgeführt. Aufgrund der Vielfalt der Färbungen wurde dafür eine Zusammenfassung der Farben vorgenommen. Diese erfolgte angepasst an die Ergebnisse der unterschiedlichen chromogenen Nährmedien separat für alle Medien. Für jede *Candida*-Spezies und Färbung wurden Vierfeldertafeln erstellt, die bei bekannter Subspezies die Ausprägung einer konkreten Farbe als Testkriterium nutzen. Es wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädikativer Wert sowie die Effektivität berechnet. Die Auswertung erfolgte nur für die Ergebnisse nach 48 und 72 Stunden, da nach 24 Stunden die Färbung der Kolonien

noch sehr schwach ausgeprägt war. Tabelle 4.12 zeigt exemplarisch die Vierfeldertafel für *C. albicans* und die Färbung Grün nach 48 Stunden auf BBL CHROMagar Candida. Die Erstellung der Tabellen und die Auswertung erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel.

Test: BBL CHROMagar Candida, 48 Stunden		<i>Candida albicans</i> liegt vor	andere <i>Candida spp.</i> liegt vor	gesamt
Färbung:	positiv	31	22	53
Grün	negativ	1	47	48
gesamt		32	69	101

**Tabelle 4.12** Beispiel einer Vierfeldertafel für *C. albicans* und die Färbung Grün nach 48 Stunden auf BBL CHROMagar Candida

Farbe		Pantone-Farbcode
Grün	<i>Hellgrün</i>	331U, 338U, 344U, 345U, 351U, 352U, 353U, 572U, 573U, 358U, 359U, 572U, 573U, 578U, 3245U, 3385U, 7464U, 7478U, 7485U
	<i>Mittelgrün</i>	326U, 339U, 340U, 346U, 347U, 354U, 355U, 360U, 576U, 577U, 618U, 3258U, 3265U, 3268U, 3272U, 3278U, 3395U, 3405U, 361U, 7479U, 7480U, 7481U, 7482U, 7725U, Pantone Green U
	<i>Olivgrün</i>	576U, 7473U, 7491U, 7495U, 7745U
	<i>Dunkelgrün</i>	334U, 335U, 349U, 569U, 3282U, 3285U, 3288U, 3295U, 3415U, 3425U, 7484U
	<i>Dunkel-Olivgrün</i>	7742U, 7743U
Türkis	<i>Helltürkis</i>	290U, 317U, 324U, 318U, 319U, 3105U, 3115U, 324U, 630U, 628U, 3242U, 3245U, 3252U, 3255U, 7464U, 7465U, 7471U
	<i>Mitteltürkis</i>	313U, 314U, 320U, 321U, 325U, 326U, 327U, 569U, 3125U, 3135U, 3252U, 3262U, 3265U, 3272U, 3275U, 7460U, 7467U, 7709U, 7710U, 7711U, 7716U
	<i>Dunkeltürkis</i>	308U, 315U, 322U, 323U, 328U, 329U, 330U, 634U, 3145U, 3155U, 3165U, 3282U, 3285U, 3292U, 3295U, 7713U, 7714U, 7715U
Blau	<i>Hellblau</i>	7681U
	<i>Mittelblau</i>	307U, 632U, 633U, 640U, 641U, 7704U, Pantone Process Blue U
	<i>Dunkelblau</i>	302U, 309U, 281U, 533U, 634U, 2955U, 7685U, 7705U, 7714U
Blaugrau		7476U, 7475U, 7668U, 7674U,
Rosa	<i>Hellrosa</i>	503U, 509U, 677U, 684U, 685U, 691U, 705U, 5035U, 7429U, 7430U, 7479U
	<i>Mittelrosa</i>	500U, 501U, 507U, 508U, 679U, 680U, 686U, 687U, 694U, 4995U, 5005U, 7431U, 7432U
	<i>Dunkelrosa</i>	688U, 689U, 492U, 4985U, 4995U
Lila	<i>Helllila</i>	523U, 524U, 651U, 666U, 5155U, 5165U, 5175U, 5225U, 5235U, 5242U, 5245U, 5295U, 7437U, 7445U
	<i>Mittellila</i>	521U, 667U, 766U, 5145U, 5215U, 5285U, 7440U, 7654U, 7655U, 7656U, 7660U, 7661U, 7662U, 7663U, 7676U,
	<i>Dunkellila</i>	520U, 260U, 519U, 520U, 668U, 2627U, 2765U, 5125U, 5135U, 7657U, 7658U, 7659U, 7664U, 7665U
Lilagrau		7671U
Gelb	<i>Hellgelb</i>	7401U, 7402U
	<i>Mittelgelb</i>	402U, 7506U, 7758U
Braun	<i>Hellbraun</i>	480U, 481U, 482U, 719U, 7515U, 7562U, 7590U
	<i>Mittelbraun</i>	139U, 479U, 7510U, 7557U, 7573U, 7586U, 7587U
	<i>Dunkelbraun</i>	477U, 7581U, 7575U, 7609U
	<i>Gelbbraun</i>	4755U, 7407U, 7555U, 7556U, 7563U, 7590U
	<i>Rotbraun</i>	209U, 696U

Tabelle 4.13 Zuordnung der Pantone-Farbcodes zu Farbschattierungen



## 5 Ergebnisse

Die Anzucht der 101 *Candida*-Stämme erfolgte wie in Kapitel 4.4 beschrieben. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde das Wachstum und der Farbumschlag fotografisch dokumentiert und eine visuelle Farbbestimmung vorgenommen (siehe Abschnitt 4.5 und 4.6). Für die statistische Auswertung wurden ausschließlich die Ergebnisse nach 48- und 72-stündiger Inkubation herangezogen und die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Farbschattierungen zusammengefasst. Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich im Anhang (Tabelle 9.2).

### 5.1 MAST ID - CHROMagar Candida

Bei der Anzucht der *Candida*-Stämme auf Mast ID - CHROMagar Candida fiel auf, dass *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* in türkisen und grünen Schattierungen wuchsen, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* bildeten lila und rosa Färbungen aus. *C. tropicalis* unterschied sich, indem er zunächst lilafarbene und später zunehmend türkise bzw. blaue Färbungen ausprägte.

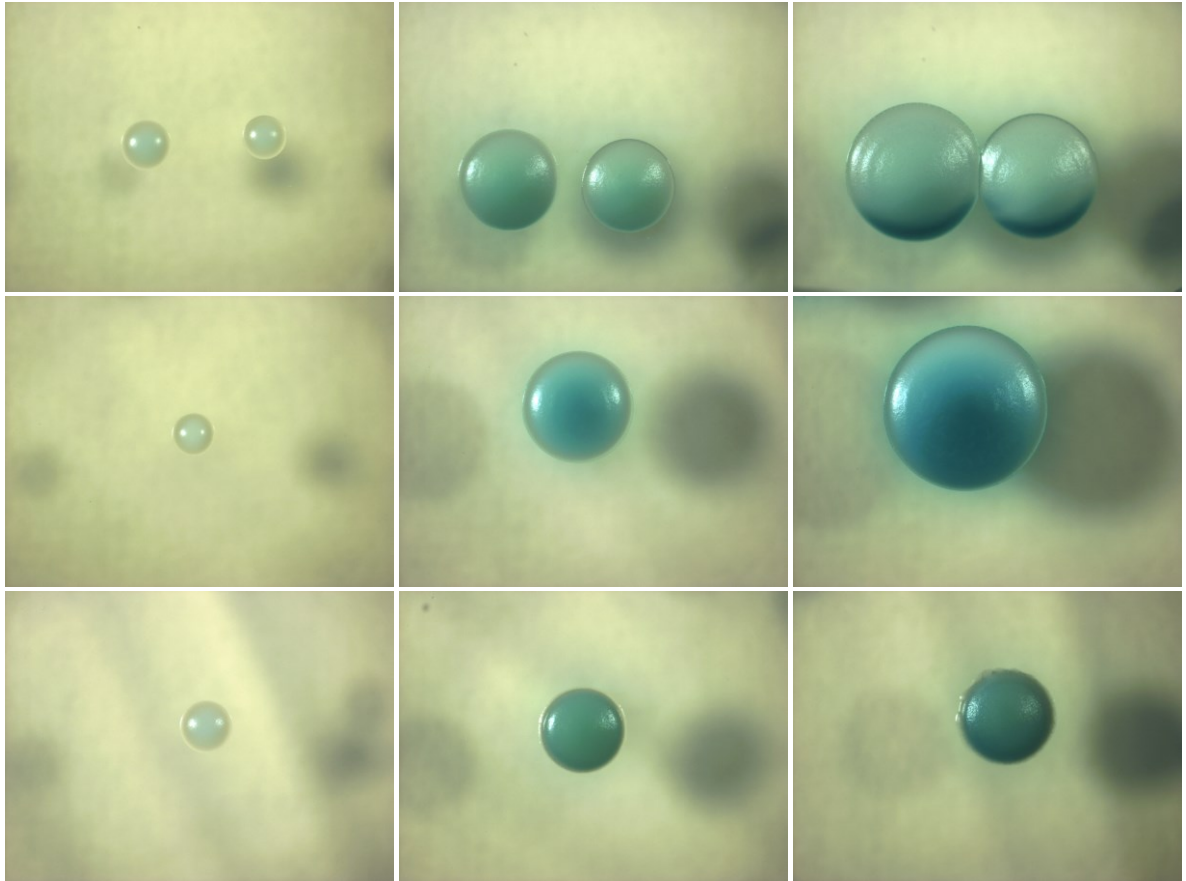
Nach 24 Stunden wies *C. africana* ein spärliches weißes Wachstum auf. Auch nach 48 Stunden blieb ein Stamm (14 %) weiß. Zwei Hefen (29 %) bildeten helltürkise, vier (57 %) mitteltürkise Kolonien aus. Im Verlauf intensivierten sich die Farben, sodass nach 72 Stunden zwei Pilze (29 %) mitteltürkise und fünf (71 %) dunkeltürkise Färbungen zeigten (siehe Abbildung 5.1). Zudem fiel ein ungewöhnliches Wachstumsmuster auf. Ab einer gewissen Koloniegroße bildeten sich, wie in Abbildung 5.1 zu sehen, bei allen sieben Stämmen, ausgehend von einer runden Kolonieform, zipfelartige Ausläufer. Dieses Muster zeigte sich in unterschiedlich starker Ausprägung ausschließlich bei *C. africana*.



**Abbildung 5.1** *C. africana* auf MAST ID - CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

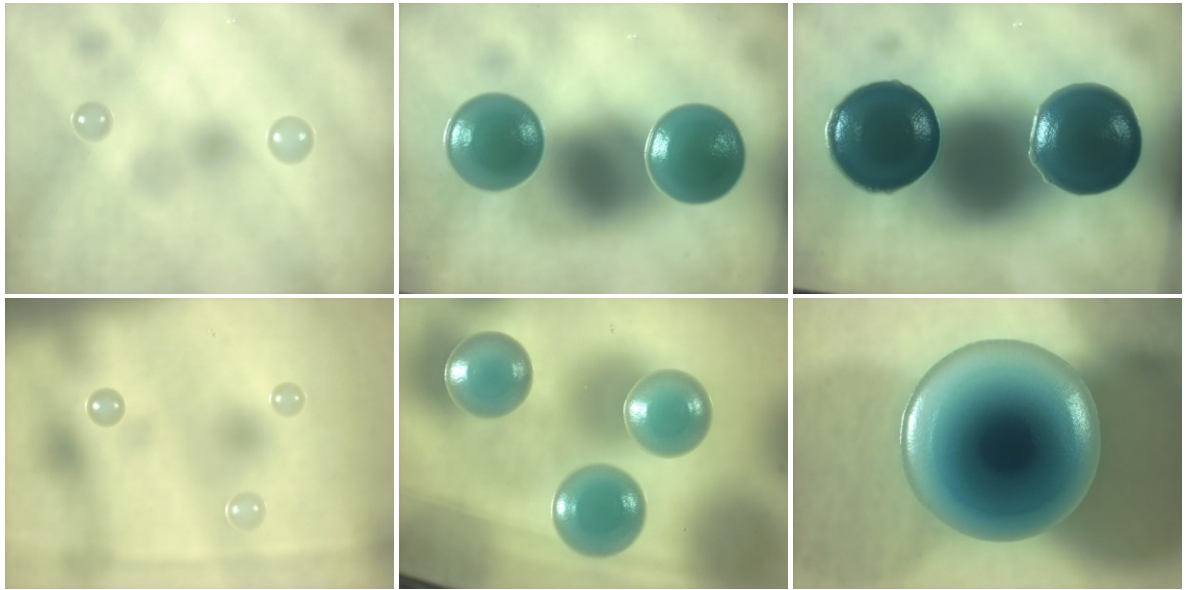
Die anderen Subspezies wiesen eine runde Wuchsform auf. *C. albicans* präsentierte eine sehr inhomogene Farbverteilung, wie in Abbildung 5.2 zu sehen. Nach 24 Stunden lagen auf einer Agarplatte (3 %) weiße, auf 26 (81 %) hellgrüne und auf fünf (19 %) helltürkise Kolonien vor. Nach 48 Stunden wuchs *C. albicans* vor allem in Grüntönen. Ein Stamm (3 %) entwickelte hellgrüne und 23 (72 %) weitere mittelgrüne Färbungen. Außerdem

bildeten drei Pilze (9 %) hell-türkise, vier (13 %) mitteltürkise und einer (3 %) dunkeltürkise Kolonien aus. Nach 72 Stunden verlagerte sich die Farbverteilung in Richtung Türkis, sodass eine hellgrün (3 %), vier mittelgrün (12 %), eine dunkelgrün (3 %), sechs helltürkis (19 %), 15 mitteltürkis (47 %) und fünf dunkeltürkis (16 %) bewachsene Agarplatten vorlagen.



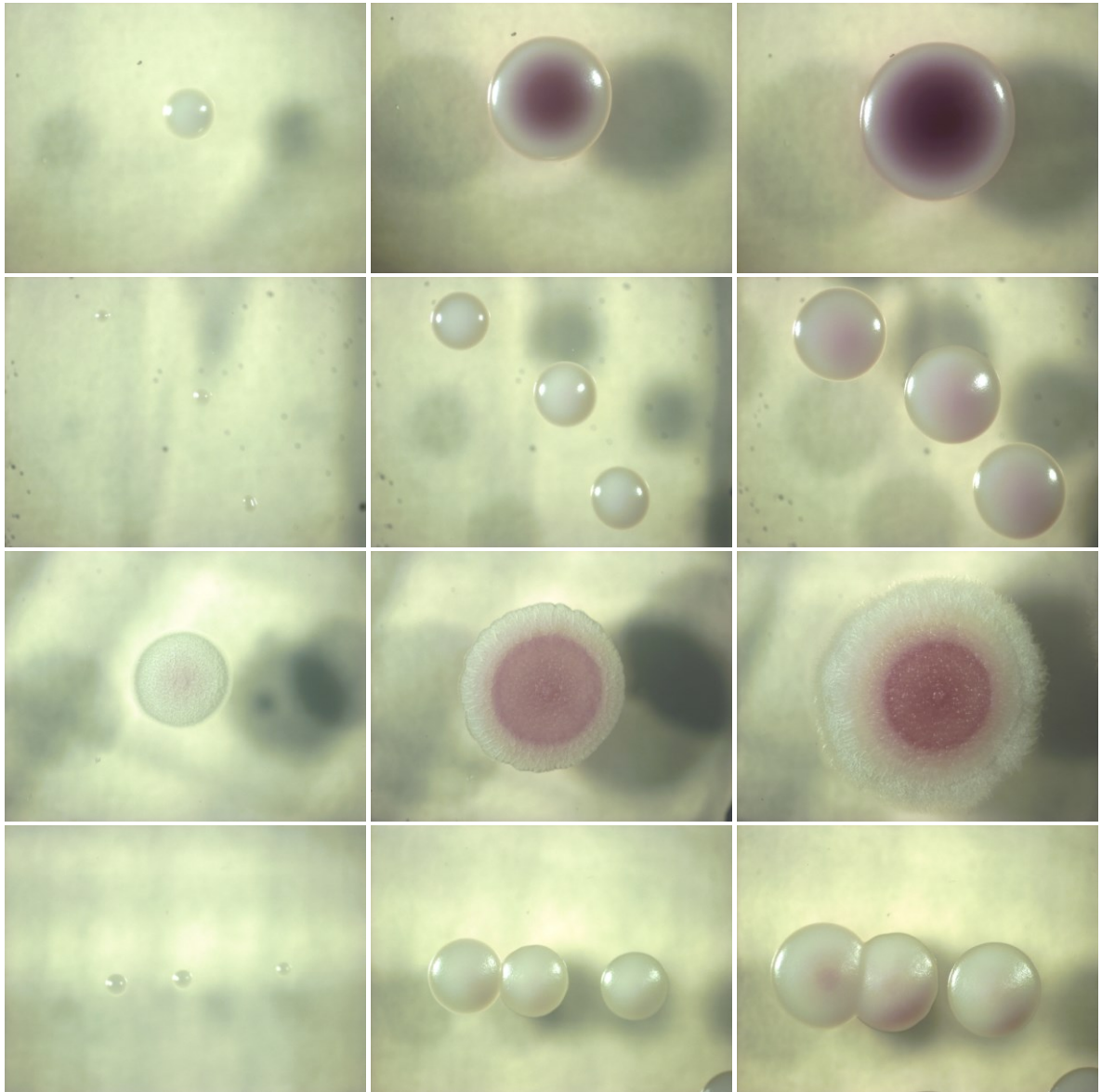
**Abbildung 5.2** Drei *C. albicans*-Stämme (von oben nach unten) auf MAST ID - CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Auch *C. dubliniensis* wies ein uneinheitliches Farbspektrum auf. Nach 24 Stunden hatte sich bei allen Stämmen noch keine Farbe ausgeprägt. Erst nach 48 Stunden fanden sich bei 19 Pilzen (86 %) mittelgrüne und bei drei (14 %) mitteltürkise Kolonien. Nach 72 Stunden intensivierten sich die Farben und das Verteilungsmuster verschob sich, ähnlich wie bei *C. albicans*, zugunsten von Türkis. Es lagen zwei mittelgrün (9 %), acht dunkelgrün (36 %) und zwölf dunkeltürkis (55 %) gefärbte Stämme vor (siehe Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3** Zwei *C. dubliniensis*-Stämme (von oben nach unten) auf MAST ID - CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

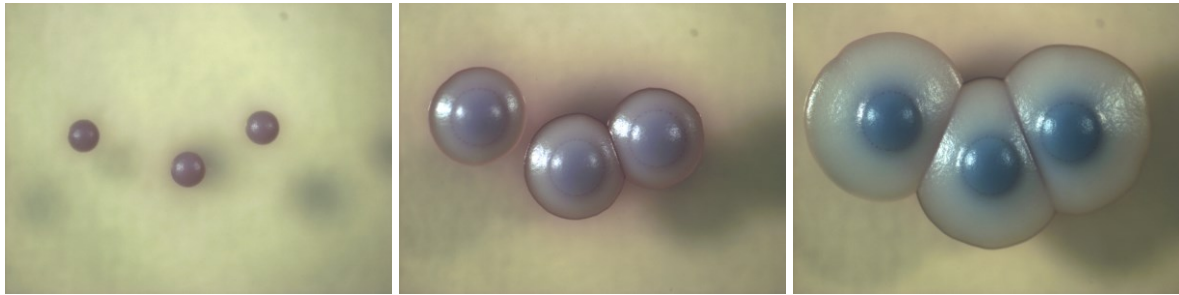
Drei der sechs *C. glabrata*-Stämme (50 %) wiesen nach 24 Stunden noch keine Farbentwicklung auf. Weitere drei (50 %) präsentierten sich helllila. Nach 48 Stunden prägten sich auf drei Agarplatten (50 %) dunkelrosa und auf drei weiteren (50 %) dunkellila Kolonien aus. Im Verlauf entwickelten zwei der drei dunkelrosa gewachsenen Pilze ebenfalls eine dunkellila Färbung, sodass nach 72 Stunden ein dunkelrosa (17 %) und fünf dunkellila gefärbte Stämme (83 %) vorlagen (siehe Abbildung 5.4). Auch *C. guilliermondii* wies nach 24 Stunden nur auf einer Agarplatte (14 %) hellrosa Kolonien auf. Alle weiteren sechs (86 %) zeigten eine weiße Färbung. Nach 48 Stunden fand sich die Rosafärbung bei fünf Stämmen (72 %) und nach 72 Stunden hatte alle Pilze eine rosa Schattierung angenommen. Darunter waren drei hellrosa (43 %), eine mittelrosa (14 %) und drei dunkelrosa (43 %) gefärbte Hefen (siehe Abbildung 5.4). Alle *C. krusei*-Stämme zeigten nach 24 Stunden ein hellrosa Wachstum. Nach 48 Stunden dunkelten sie zu einem Mittelrosa nach und im Verlauf der nächsten 24 Stunden entwickelte eine Hefe (20 %) eine mittelbraune Färbung (siehe Abbildung 5.4). Auffällig war außerdem die bei allen Stämmen auftretende flache, raue, großflächige Morphologie, die von keiner anderen untersuchten Subspezies auf diese Weise ausgebildet wurde. *C. parapsilosis* wies nach 24 Stunden ein spärliches, weißes Wachstum auf. Auch nach 48 Stunden prägte nur ein Stamm (6 %) eine hellrosa Färbung aus. Nach 72 Stunden fanden sich auf fünf Agarplatten (29,5 %) hellrosa, auf fünf (29,5 %) mittelrosa und auf sieben (41 %) weiße Kolonien (siehe Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* (von oben nach unten) auf MAST ID - CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Vier der fünf *C. tropicalis*-Stämme (80 %) wuchsen nach 24 Stunden in mittellila, einer (20 %) in dunkellila Farben. Nach 48 Stunden blieb ein Pilz (20 %) mittellila, einer (20 %) bildete helltürkise und ein weiterer (20 %) dunkeltürkise Kolonien aus. Zwei Stämme präsentierten sich Graublau. Nach 72 Stunden prägte ein Stamm (20 %) mitteltürkise und ein weiterer (20 %) dunkeltürkise Farben aus. Zwei Hefen zeigten blaue sowie eine graublaue Schattierungen (siehe Abbildung 5.5). Auffallend war, dass nach 48 Stunden drei der fünf *C. tropicalis*-Stämme einen deutlichen lilafarbenen Farbhof ausprägten, bei dem die Farbpigmente ausgehend von der Kolonie in die Umgebung diffundierten. Eine Hefe wies einen schwachen, eine weitere keinen Farbhof auf. Nach 72 Stunden verblasste dieses besondere Merkmal, sodass sich bei drei Pilzen ein schwacher und bei zwei kein Farbhof fand.





**Abbildung 5.5** *C. tropicalis* auf MAST ID - CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die, in Tabelle 5.1 aufgeführten, Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.2.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	Grün		Türkis		Blau/-Grau		Lila		Rosa/Braun		Weiß	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	0	0	6	7	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>C. albicans</i> (32)	24	6	8	26	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	19	10	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	0	0	0	0	0	0	3	5	3	1	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (7)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7	2	0
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	16	7
<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	2	2	2	3	1	0	0	0	0	0

**Tabelle 5.1** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf MAST ID - CHROMagar Candida

Für den MAST ID - CHROMagar Candida-Agar wiesen die statistischen Ergebnisse darauf hin, dass keine Differenzierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* möglich ist. Es ergab sich eine Sensitivität und Spezifität von 0,75/0,19 und 0,72/0,86 für *C. albicans* sowie von 0,86/0,45 und 0,7/0,92 für *C. dubliniensis* (48/72 Stunden) bei geringen positiv prädikativen Vorhersagewerten. *C. africana* fiel durch die zipfelförmige Morphologie auf und erreichte dadurch eine Sensitivität und Spezifität von 1 nach 48/72 Stunden. *C. glabrata* bildete nach 48/72 Stunden einen hohen Anteil lilafarbener Kolonien aus. Dadurch ergaben sich Sensitivitäten von 0,5/0,83 und Spezifitäten von 0,99/1 bei einem ppV von 0,75/1. Der geringe ppV nach 48 Stunden kam durch das Auftreten eines lilafarbenen Stammes bei *C. tropicalis* zustande. *C. krusei* wies nach 48 Stunden für die Farbe Rosa eine hohe Effektivität bei gleichzeitig niedrigem ppV auf, da auch *C. glabrata* und *C. parapsilosis* rosafarbene Schattierungen ausprägten. *C. parapsilosis* bildete außerdem weiße Kolonien, sodass nach 48 Stunden eine Sensitivität von 0,94 und eine Spezifität von 0,96 für Weiß vorlagen. *C. krusei* konnte aufgrund der rauen Morphologie

mit einer Sensitivität, Spezifität und Effektivität sowie einem ppV und npV von 1 jedoch eindeutig identifiziert werden. *C. tropicalis* prägte als Einziger blaue bzw. blaugraue Färbungen aus, sodass sich nach 48/72 Stunden Sensitivitäten von 0,4/0,5 und Spezifitäten von je 1 ergaben. Zusätzlich trat ein braun-lilafarbener Ring auf. Dadurch lag nach 48/72 Stunden eine Sensitivität von 0,8/0,6 und eine Spezifität von je 1 vor.

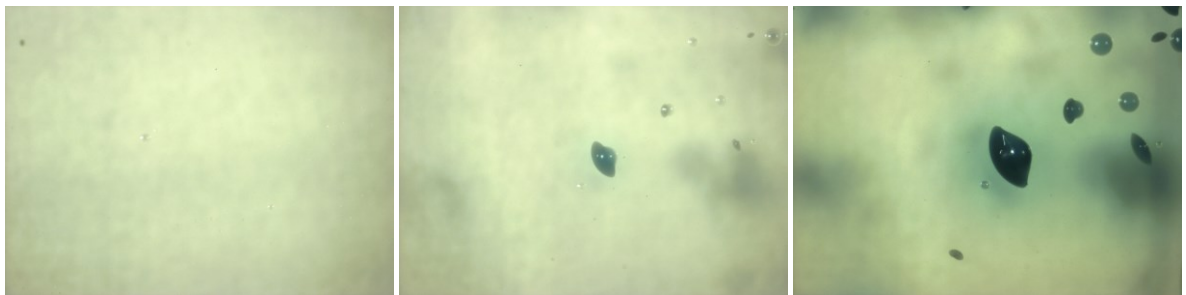
Farbe/Spp.	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Grün</u></b>										
<i>C. africana</i>	0	0	0,54	0,83	0	0	0,88	0,92	0,5	0,77
<i>C. albicans</i>	0,75	0,19	0,72	0,86	0,56	0,38	0,86	0,69	0,73	0,64
<i>C. dubliniensis</i>	0,86	0,45	0,7	0,92	0,44	0,63	0,95	0,86	0,73	0,82
<b><u>Türkis</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,86	1	0,86	0,57	0,32	0,15	0,99	1	0,86	0,6
<i>C. albicans</i>	0,25	0,81	0,84	0,7	0,42	0,55	0,71	0,89	0,65	0,73
<i>C. dubliniensis</i>	0,14	0,55	0,8	0,56	0,16	0,26	0,77	0,81	0,65	0,55
<i>C. tropicalis</i>	0,4	0,4	0,82	0,53	0,11	0,04	0,96	0,94	0,8	0,52
<b><u>Blau/Blaugrau</u></b>										
<i>C. tropicalis</i>	0,4	0,6	1	1	1	1	0,97	0,97	0,97	0,98
<b><u>Lila</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	0,5	0,83	0,99	1	0,75	1	0,97	0,99	0,96	0,99
<i>C. tropicalis</i>	0,2	0	0,97	0,95	0,25	0	0,96	0,95	0,93	0,9
<b><u>Rosa/Braun</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	0,5	0,17	0,88	0,77	0,21	0,04	0,97	0,94	0,86	0,73
<i>C. guilliermondii</i>	0,71	1	0,9	0,83	0,36	0,3	0,98	1	0,89	0,84
<i>C. krusei</i>	1	1	0,91	0,81	0,36	0,22	1	1	0,91	0,82
<i>C. parapsilosis</i>	0,06	0,59	0,84	0,85	0,07	0,43	0,82	0,91	0,71	0,8
<b><u>Weiß</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,14	0	0,81	0,93	0,05	0	0,93	0,93	0,76	0,86
<i>C. guilliermondii</i>	0,29	0	0,82	0,93	0,11	0	0,93	0,93	0,78	0,86
<i>C. parapsilosis</i>	0,94	0,41	0,96	1	0,84	1	0,99	0,89	0,96	0,9
<b><u>Morphologische/ farbliche Besonderheiten</u></b>										
<i>C. africana</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. krusei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. tropicalis</i>	0,8	0,6	1	1	1	1	0,99	0,98	0,99	0,98

**Tabelle 5.2** Statistische Auswertung der auf MAST ID - CHROMagar Candida ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden

## 5.2 BBL CHROMagar Candida

Auf dem BBL CHROMagar Candida zeigte sich in der Farbausprägung nach 24, 48 und 72 Stunden eine Zweiteilung unter den *Candida*-Subspezies. Alle *C. africana*-, *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämme wiesen verschiedene Schattierungen von Grün oder Türkis auf. Die getesteten *C. glabrata*-, *C. guilliermondii*-, *C. krusei*- und *C. parapsilosis*-Stämme hingegen wuchsen in lila, rosa und braunen Farben. *C. tropicalis* nahm eine Sonderstellung ein, da er sich zunächst lila und im Verlauf türkis färbte.

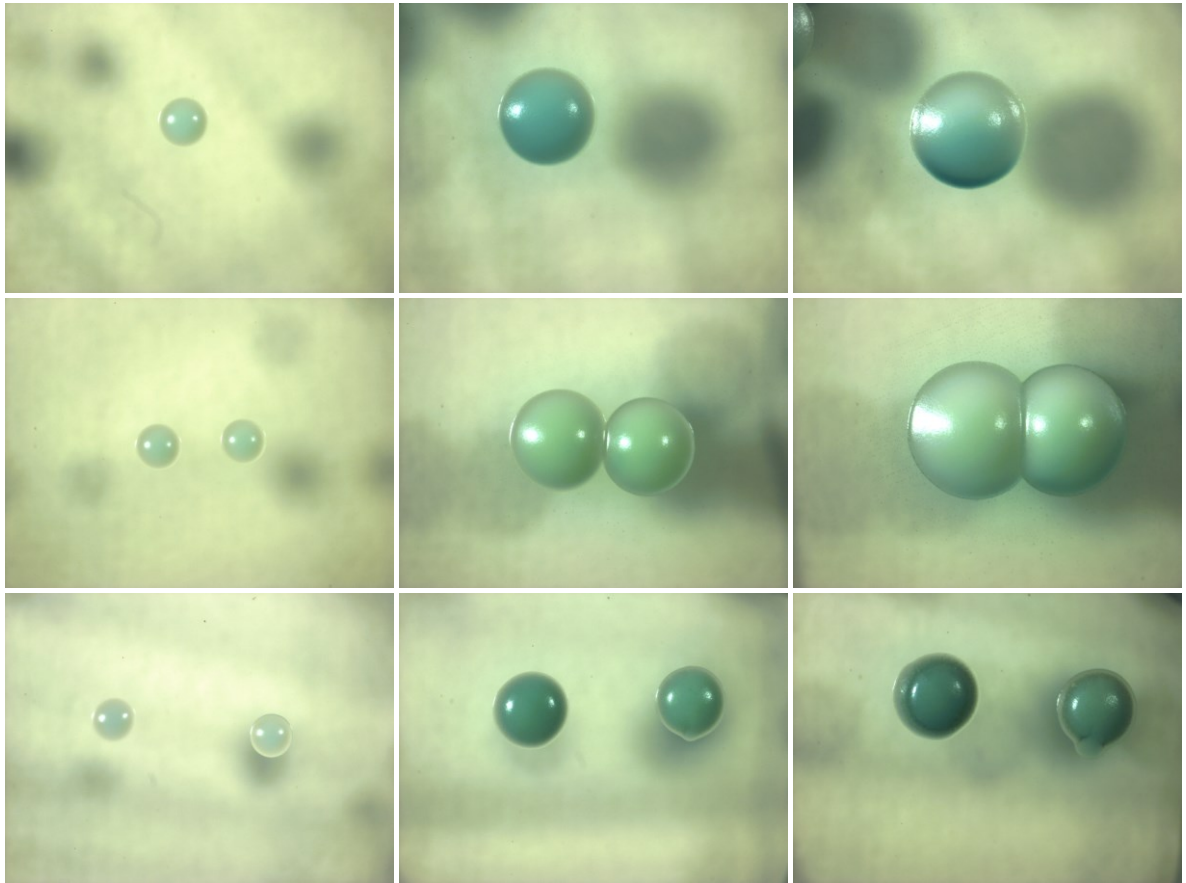
Sechs der sieben untersuchten *C. africana*-Stämme (86 %) wiesen nach 24 Stunden keinen Farbumschlag auf, das heißt, sie präsentierten sich als kleinste, durchsichtige Kolonien. Eine Hefe (14 %) zeigte zu diesem Zeitpunkt kein Wachstum. Nach 48 Stunden waren alle Stämme angewachsen. Davon waren drei (43 %) weiterhin farblos. Auf vier Agarplatten (57 %) hatte sich eine hell- bis mitteltürkise Färbung entwickelt, die sich nach 72 Stunden auf allen Platten ausprägte und z.T. intensivierte, sodass die Kolonien mittel- bis dunkeltürkis waren (siehe Abbildung 5.6). Zudem fiel ein ungewöhnliches Wachstumsmuster auf. Ab einer gewissen Koloniegröße bildeten sich, genau wie auf dem MAST ID – CHROMagar Candida, bei allen sieben Stämmen, ausgehend von einer runden Wuchsform, zipfelartige Ausläufer. Dieses Muster zeigte sich in unterschiedlich starker Ausprägung ausschließlich bei der Anzucht von *C. africana*.



**Abbildung 5.6** *C. africana* auf BBL CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Alle 32 *C. albicans*-Stämme zeigten bereits nach 24 Stunden ein Wachstum und Farbumschlag nach Hellgrün bzw. Helltürkis, wobei diese Farben ausschließlich im direkten Vergleich oder mit dem Pantone Matching System voneinander zu unterscheiden waren. Nach 48 Stunden wiesen 31 der 32 Hefen (97 %) verschiedene Grüntöne von Hell- bis Dunkelgrün auf. Dabei war Mittelgrün mit 66 % am stärksten vertreten. Ein Stamm (3 %) wuchs in mitteltürkisen Schattierungen. In den nächsten 24 Stunden dunkelte die Grünfärbung nach, sodass weniger hellgrüne (22 %) und mittelgrüne (33 %), jedoch mehr dunkelgrüne (19 %) Kolonien zu sehen waren. Zudem färbten sich acht Stämme (25 %)

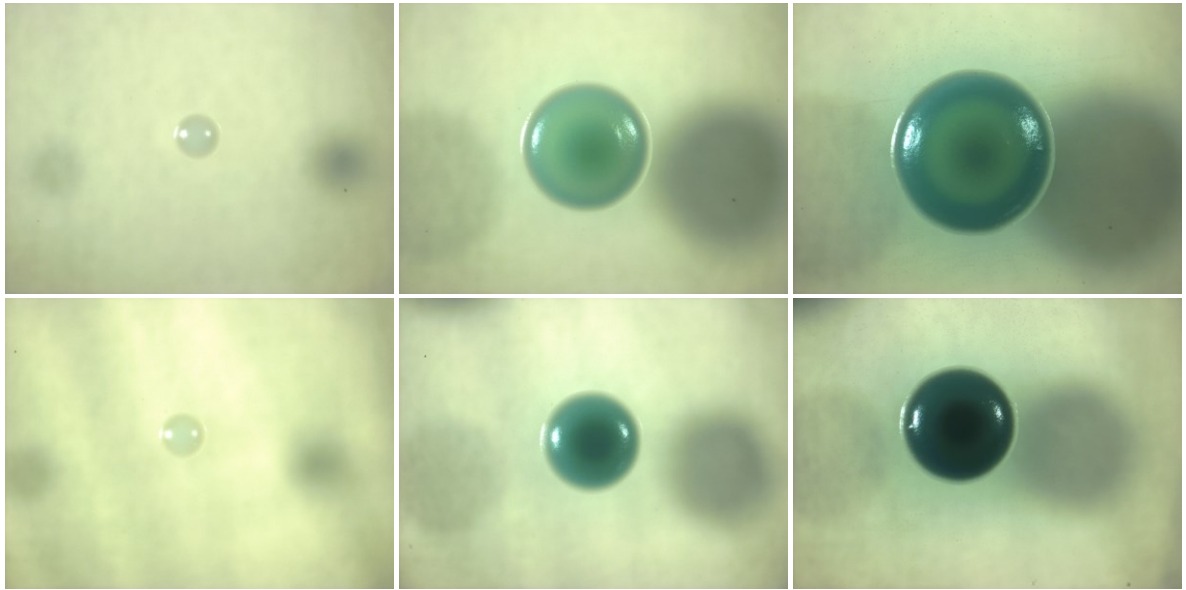
türkis ein. Insgesamt fiel bei *C. albicans* die inhomogene Verteilung der Farbschattierungen von Grün und Türkis, auch im Verlauf, auf (siehe Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7** Drei *C. albicans*-Stämme (von oben nach unten) auf BBL CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

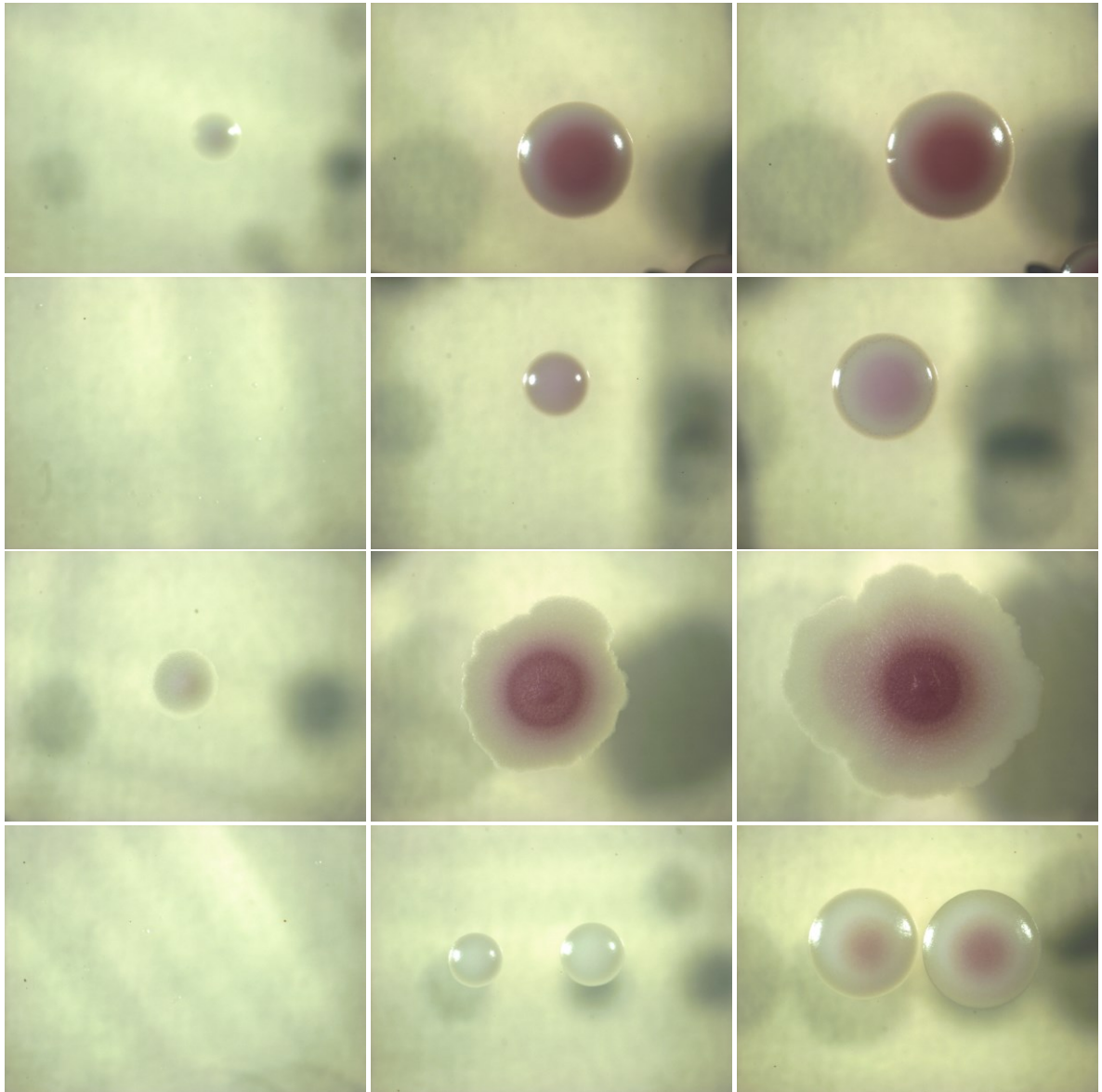
Ähnlich wie bei *C. africana* fand sich bei *C. dubliniensis* nach 24 Stunden bei 18 der 22 Stämme (82 %) zunächst keine Farbausprägung. Nur vier Hefen (18 %) entwickelten eine hellgrüne Färbung. Innerhalb der folgenden 24 Stunden prägten alle Kolonien ein Grünfärbung aus, die sich sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden vor allem als Mittelgrün (86 %) aber auch als Dunkelgrün (14 %) zeigte (siehe Abbildung 5.8).





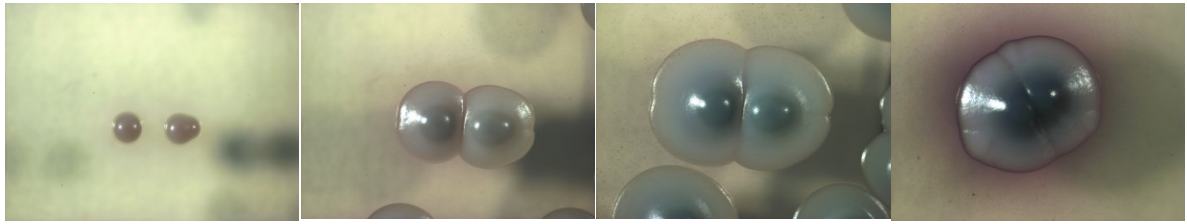
**Abbildung 5.8** Zwei *C. dubliniensis*-Stämme (von oben nach unten) auf BBL CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

*C. glabrata* bildete in 83 % der Fälle nach 24 Stunden noch keine Färbung. Nur einer der sechs Stämme (17 %) zeigte eine hellrosa bis hellbraune Farbe, die nach 48 Stunden bei zwei Stämmen (33 %) zu finden war. Vier (67 %) weitere präsentierten sich mittelrosa. Nach 72 Stunden intensivierte sich die Färbung, sodass sich auf einer Agarplatte mittelrosa (17 %), auf zwei dunkelrosa (33 %), auf einer lila (17 %) und auf zwei Weiteren hellbraune (33 %) Kolonien fanden (siehe Abbildung 5.9). *C. guilliermondii* bildete nach 24 Stunden ausschließlich weiße Kolonien, die sich im Verlauf auf einer Platte mittelrosa (14 %), auf vier helllila (57 %) und auf einer mittellila (14 %) färbten. Nach 72 Stunden zeigte sich weiterhin ein mittelrosa Stamm (14 %). Alle anderen Hefen (86 %) prägten mittellilafarbene Schattierungen aus (siehe Abbildung 5.9). Alle *C. krusei*-Stämme wiesen bereits nach 24 Stunden eine rosa Färbung auf. Davon waren vier hellrosa (80 %) und einer mittelrosa (20 %). Nach weiterer Bebrütung prägten vier Stämme (80 %) eine mittelrosa Farbe aus. Eine Kolonie (20 %) wuchs dunkelrosa und verblasste, wie alle *C. krusei*-Stämme, nach 72 Stunden farblich zu einem Mittelrosa (siehe Abbildung 5.9). Ein *C. parapsilosis*-Stamm (6 %) zeigte zunächst kein und weitere 16 Stämme (94 %) ein spärliches, weißes Wachstum. Auch nach 48 Stunden hatten sich noch keine Einzelkolonien entwickelt. Erst nach 72 Stunden konnte bei 14 Hefen (82 %) ein Farbumschlag nach Hell- bis Mittelrosa verzeichnet werden (siehe Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* (von oben nach unten) auf BBL CHROMagar Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Nach 24 Stunden wies ein *C. tropicalis*-Stamm (20 %) eine mittellila und vier weitere (80 %) eine lila-graue Farbe auf. Im Verlauf der nächsten 24 Stunden färbten sich alle Pilze dunkelblau-türkis ein. Nach 72 Stunden waren auf vier Agarplatten (80 %) dunkelblau-türkis und auf einer (20 %) mittelblaue Kolonien zu finden. Auffallend war, dass nach 48 Stunden vier der fünf *C. tropicalis*-Stämme einen lilafarbenen Farbhof ausprägten, bei dem die Farbpigmente ausgehend von der Kolonie in die Umgebung diffundierten. Nach 72 Stunden wiesen alle Stämme dieses Merkmal auf (siehe Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.10** *C. tropicalis* auf BBL CHROMagar Candida nach 24 und 48 sowie, in zwei Aufnahmen verschiedener Kolonien desselben Stammes, nach 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die in Tabelle 5.3 aufgeführten Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.4.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	Grün		Türkis		Blau/Türkis		Lila		Rosa/Braun		Weiß	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	0	0	4	7	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>C. albicans</i> (32)	31	24	1	8	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	22	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	0	0	0	0	0	0	0	1	6	5	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (7)	0	0	0	0	0	0	5	6	1	1	1	0
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	17	3
<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 5.3** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf BBL CHROMagar Candida

Die statistischen Ergebnisse des BBL CHROMagar Candida wiesen auf eine fehlende Differenzierbarkeit von *C. albicans* und *C. dubliniensis* hin. Für die Farbe Grün zeigte sich eine Sensitivität und Spezifität von 0,97/0,75 und je 0,68 für *C. albicans* sowie je 1 und 0,61/0,7 für *C. dubliniensis* (48/72 Stunden) bei niedrigen positiv prädikativen Werten von 0,42 bis 0,58. *C. africana* unterschied sich vor allem durch das zipfelförmige Wachstum, das Werte von je 1 für Sensitivität, Spezifität, ppV, npV und Effektivität aufwies. Die drei Subspezies zeigten als Einzige ein Farbspektrum von grün bis türkis, sodass sich eine gruppierte Sensitivität und Spezifität von 0,95/1 und je 1 ergab (48/72 Stunden). Die statistischen Ergebnisse für *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* deuteten auf eine fehlende Differenzierbarkeit hin. *C. krusei* konnte jedoch aufgrund der typischen rauen Wachstumsform eine Sensitivität und Spezifität von je 1 (48/72 Stunden) erlangen. *C. guilliermondii* zeigte einen hohen Anteil lilafarbener Kolonien und erreichte dadurch eine Sensitivität und Spezifität von 0,71/0,86 und 1/0,99 (48/72 Stunden). *C. tropicalis* bildete als einzige Subspezies blaue/blau-türkise Schattierungen aus und konnte deshalb mit einer Sensitivität und Spezifität von je 1 von allen andern Subspezies unterschieden

werden. Zusätzlich trat ein charakteristischer braun-lilafarbener, die Kolonie umgebender Ring mit eine Sensitivität von 0,8/1 und eine Spezifität von je 1 nach 48/72 Stunden auf.

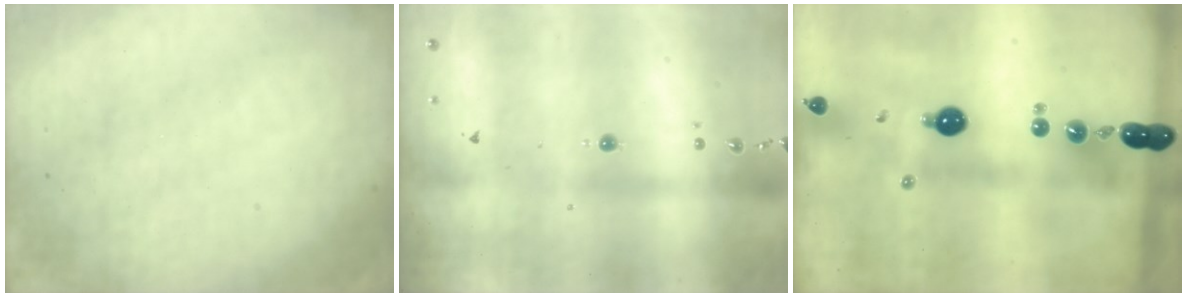
Farbe/ Spp.	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Grün</u></b>										
<i>C. africana</i>	0	0	0,44	0,51	0	0	0,85	0,87	0,41	0,48
<i>C. albicans</i>	0,97	0,75	0,68	0,68	0,58	0,52	0,98	0,85	0,77	0,7
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	0,61	0,7	0,42	0,48	1	1	0,69	0,76
<b><u>Türkis</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,57	1	0,99	0,91	0,8	0,47	0,97	1	0,96	0,92
<i>C. albicans</i>	0,03	0,25	0,94	0,9	0,2	0,53	0,68	0,72	0,65	0,69
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	0,94	0,8	0	0	0,77	0,74	0,73	0,62
<b><u>Lila</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	0	0,17	0,95	0,94	0	0,14	0,94	0,95	0,89	0,89
<i>C. guilliermondii</i>	0,71	0,86	1	0,99	1	0,86	0,98	0,99	0,98	0,98
<b><u>Rosa/Braun</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	1	0,84	0,94	0,79	0,5	0,2	1	0,99	0,94	0,79
<i>C. guilliermondii</i>	0,14	0,14	0,88	0,74	0,08	0,04	0,93	0,92	0,83	0,70
<i>C. krusei</i>	1	1	0,93	0,8	0,42	0,2	1	1	0,93	0,8
<i>C. parapsilosis</i>	0	0,82	0,86	0,87	0	0,56	0,81	0,96	0,71	0,86
<b><u>Blau/Türkis</u></b>										
<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b><u>Weiß</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,43	0	0,81	0,97	0,14	0	0,95	0,93	0,78	0,9
<i>C. guilliermondii</i>	0,14	0	0,79	0,97	0,05	0	0,93	0,93	0,74	0,9
<i>C. parapsilosis</i>	1	0,18	0,95	1	0,81	1	1	0,86	0,96	0,86
<b><u>Morphologische Besonderheiten</u></b>										
<i>C. africana</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. krusei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>C. tropicalis</i>	0,8	1	1	1	1	1	0,99	1	0,99	1

**Tabelle 5.4** Statistische Auswertung der auf BBL CHROMagar Candida ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden

### 5.3 chromID Candida

Bei der Anzucht der *Candida*-Spezies auf chromID Candida fiel auf, dass sich ausschließlich bei *C. africana*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. guilliermondii* eine bunte Färbung ausprägte. Dabei zeigten *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* blaue bis türkisfe Schattierungen und *C. guilliermondii* sowie *C. tropicalis* eine rosa Färbung. Die Kolonien der *C. glabrata*-, *C. krusei*- und *C. parapsilosis*-Stämme blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum weiß.

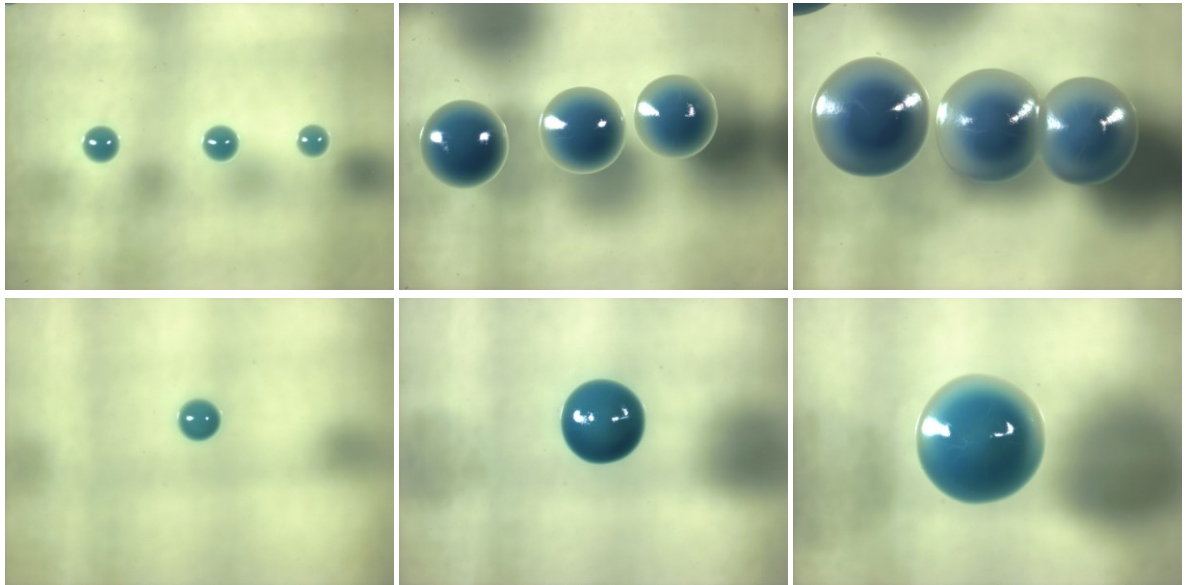
Alle *C. africana*-Stämme wiesen nach 24 und 48 Stunden farblose Kolonien auf. Erst nach 48 Stunden entwickelten sich voneinander abgrenzbare, makroskopisch farblose Einzelkolonien, die nach 72 Stunden bei sechs Hefen (68 %) eine mitteltürkise Färbung und bei einer helltürkise Färbung angenommen hatten (siehe Abbildung 5.11).



**Abbildung 5.11** *C. africana* auf chromID Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

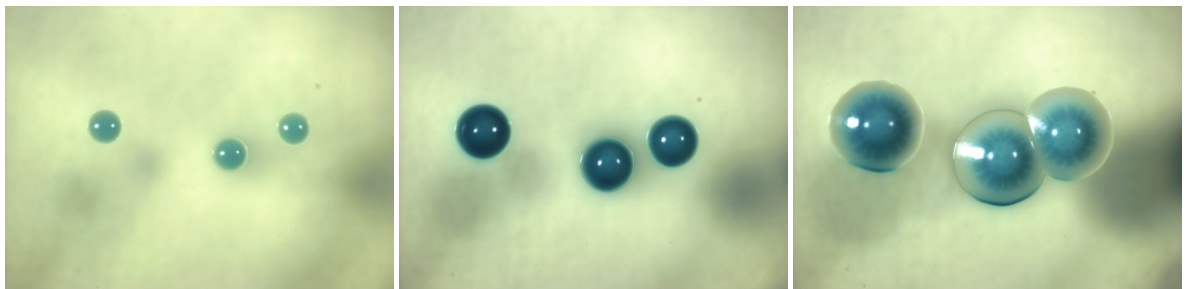
Die *C. albicans*-Kolonien wiesen bereits nach 24 Stunden zu 28 % (9) ein helltürkises und zu 72 % (23) ein mitteltürkises Wachstum auf. Im Verlauf intensivierten sich die Farben, sodass sich nach 48 Stunden zwölf Stämme mitteltürkis (38 %), einer dunkeltürkis (3 %), 18 mittelblau (56 %) und ein weiterer dunkelblau (3 %) präsentierten. Nach 72 Stunden lagen 14 mitteltürkise (44 %), ein dunkeltürkiser (3 %), 16 mittelblaue (50 %) und ein dunkelblauer (3 %) Pilz vor. Die farbliche Differenzierung zwischen Türkis und Blau war in diesem Fall nur im direkten Vergleich oder mit dem Pantone Matching System möglich, sodass die Farben Mitteltürkis und Mittelblau sowie Dunkeltürkis und Dunkelblau zusammengefasst werden können. Daraus ergibt sich eine prozentuale Verteilung nach 48 sowie 72 Stunden von 94 % (30) mitteltürkis-blauer und 6 % (2) dunkeltürkis-blauer Kolonien (siehe Abbildung 5.12).





**Abbildung 5.12** Zwei *C. albicans*-Stämme (von oben nach unten) auf chromID Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

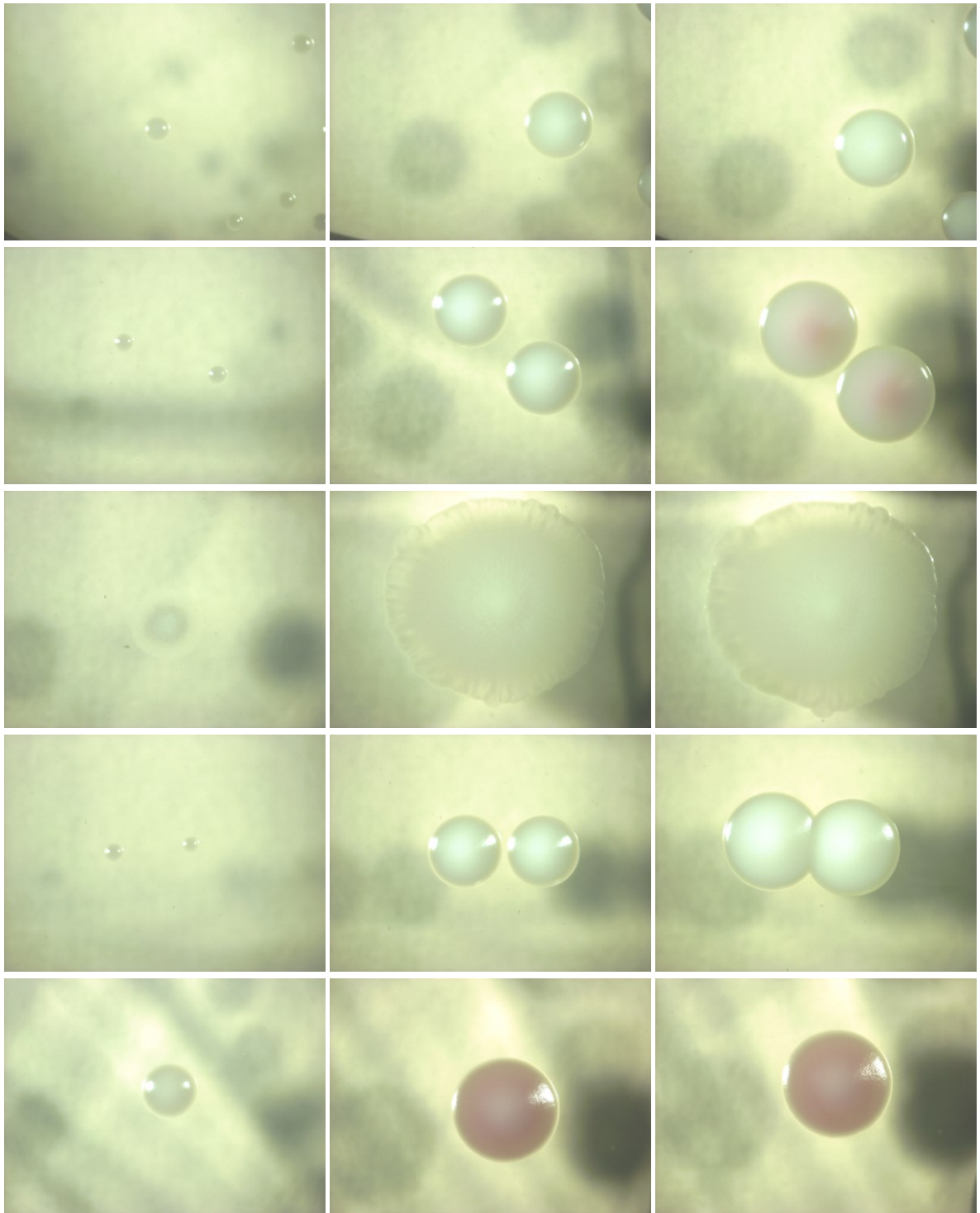
Alle *C. dubliniensis*-Stämme zeigten nach 24 Stunden eine helltürkise Färbung. Im Verlauf entwickelten 13 Pilze (59 %) mitteltürkise und neun (41 %) dunkeltürkise Schattierungen. Nach 72 Stunden waren die dunkeltürkise gewachsenen Kolonien wieder abgeblasst, sodass alle eine mitteltürkise Färbung aufwiesen (siehe Abbildung 5.13).



**Abbildung 5.13** *C. dubliniensis* auf chromID Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Nach 24 Stunden fand sich bei sieben *C. guilliermondii*-Stämmen (100 %) eine weiße Färbung. Nach 48 Stunden waren zwei Pilze (29 %) weiß und fünf (71 %) hatten eine hellrosa Schattierung angenommen. Nach weiteren 24 Stunden fanden sich auf einer Agarplatte weiße (14 %) und auf sechs (86 %) hellrosa Kolonien (siehe Abbildung 5.14). Bei vier der fünf *C. krusei*-Stämme, die alle eine weiße Färbung ausbildeten, fiel bereits nach 24 Stunden die typische, raue Morphologie auf. Ein Stamm zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum kleinere, glatte, scharf umrandete Kolonien. *C. tropicalis* zeigte nach 24 Stunden drei weiße (60 %) und zwei hellrosa (40 %) Färbungen. Nach 48 Stunden hatten sich zwei Stämme (40 %) hellrosa und drei (60 %) mittelrosa gefärbt. Im Verlauf dunkelten die Farben nach, sodass nach 72 Stunden ein hellrosa Pilz (20 %), drei mittelrosa

Pilze (60 %) und ein dunkelrosa Pilz (20 %) vorlagen. Drei der fünf *C. tropicalis*-Stämme zeigten eine raue Oberfläche, wobei eine Hefe großflächige Kolonien, ähnlich denen von *C. krusei*, bildete (siehe Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (von oben nach unten) auf chromID Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die in Tabelle 5.5 aufgeführten Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.6.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	<u>Türkis/Blau</u>		<u>Rosa</u>		<u>Weiß</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	0	7	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (32)	32	32	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	22	22	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	0	0	0	0	6	6
<i>C. guilliermondii</i> (7)	0	0	5	6	2	1
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	0	0	5	5
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0	0	0	0	17	17
<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	5	5	0	0

**Tabelle 5.5** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf chromID Candida Agar

Die statistischen Ergebnisse für *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. africana* auf chromID Candida ließen auf eine fehlende Differenzierbarkeit dieser Subspezies schließen. *C. albicans* erreichte eine Sensitivität und Spezifität von je 1 und 0,68/0,58, *C. dubliniensis* von je 1 und 0,59/0,51 (48/72 Stunden). Auffällig war, dass *C. africana* erst nach 72 Stunden eine Koloniefärbung ausbildete, die jedoch mit einer Sensitivität und Spezifität von 1 und 0,43 keine Identifizierung zuließ. Da diese Subspezies als einzige der getesteten Stämme diese Färbung aufwies, ergab sie eine gruppierte Sensitivität und Spezifität von 0,89/1 und je 1 nach 48/72 Stunden. Auch *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* konnten nicht sicher voneinander unterschieden werden. *C. krusei* wies farblich kein Alleinstellungsmerkmal auf. Aufgrund der typischen morphologischen Eigenschaften ergaben sich aber Werte von 0,8 für die Sensitivität und 0,99 für die Spezifität. *C. tropicalis* zeigte für die Farbe Rosa eine Sensitivität und Spezifität von je 1 und 0,95/0,94 (48/72 Stunden). Der geringe ppV verwies jedoch auf das Auftreten derselben Färbung bei 71/86 % (48/72 Stunden) der *C. guilliermondii*-Stämme.



Farbe/Spp.	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Türkis/Blau</u></b>										
<i>C. africana</i>	0	1	0,43	0,43	0	0,11	0,85	1	0,4	0,47
<i>C. albicans</i>	1	1	0,68	0,58	0,59	0,52	1	1	0,78	0,71
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	0,59	0,51	0,41	0,36	1	1	0,68	0,61
<b><u>Rosa</u></b>										
<i>C. guilliermondii</i>	0,71	0,86	0,95	0,95	0,5	0,55	0,98	0,99	0,93	0,94
<i>C. tropicalis</i>	1	1	0,95	0,94	0,5	0,45	1	1	0,95	0,94
<b><u>Weiß</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	1	1	0,75	0,76	0,2	0,21	1	1	0,76	0,77
<i>C. guilliermondii</i>	0,29	0,14	0,7	0,7	0,07	0,03	0,93	0,92	0,67	0,66
<i>C. krusei</i>	1	1	0,74	0,75	0,17	0,17	1	1	0,75	0,76
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,85	0,86	0,57	0,59	1	1	0,87	0,88
<b><u>Morphologische Besonderheiten</u></b>										
<i>C. krusei</i>	1	1	0,8	0,8	1	1	0,99	0,99	0,99	0,99

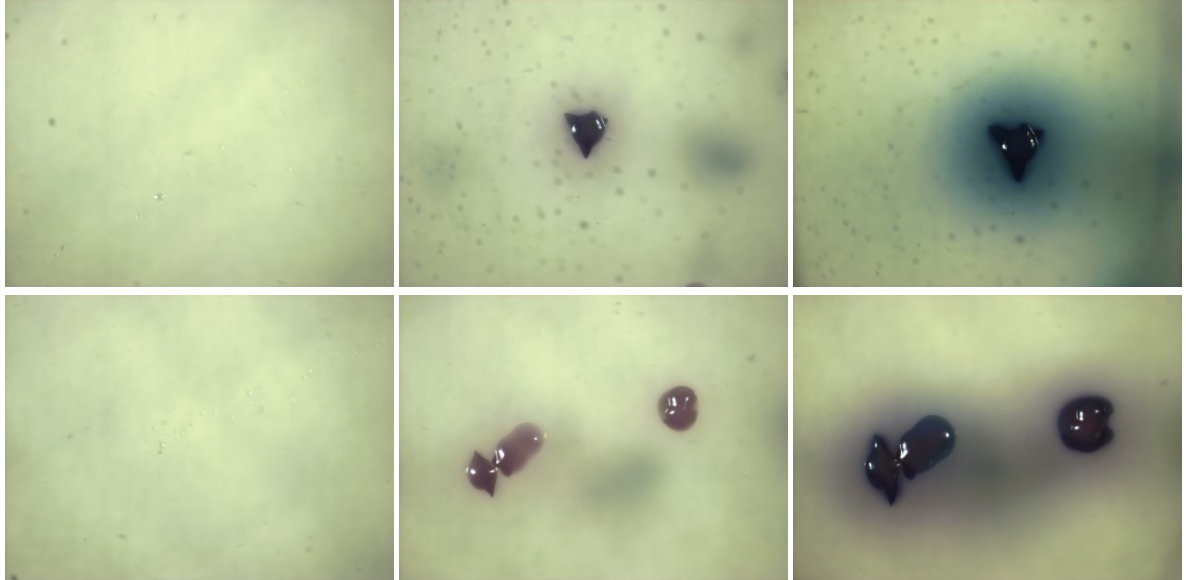
**Tabelle 5.6** Statistische Auswertung der auf chromID Candida ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden

#### 5.4 CandiSelect 4

Die Farbausprägungen der *Candida*-Kolonien auf CandiSelect 4 wiesen eine Zweiteilung auf. *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* wuchsen in lila und rosa Farben und prägten parallel dazu nach 72 Stunden z.T. türkise Schattierungen aus. *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* zeigten von Beginn an ein türkisches Wachstum.

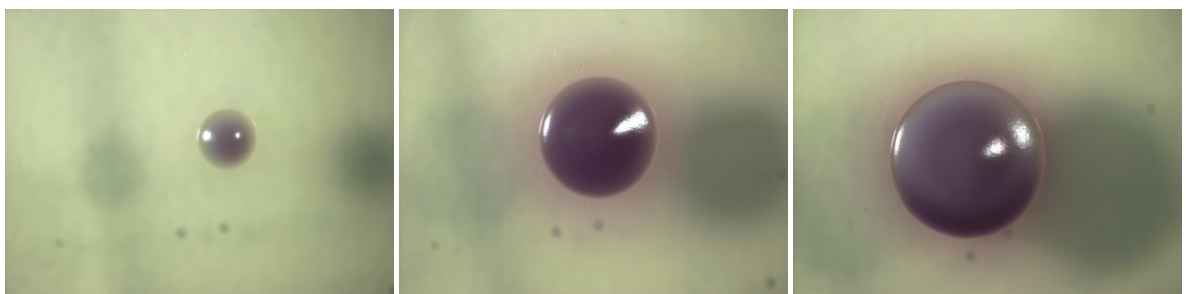
Auffällig war, dass nach 72 Stunden eine gute Differenzierung von *C. africana* gegenüber *C. albicans* und *C. dubliniensis* möglich war. Auch *C. dubliniensis* zeigte nach 72 Stunden farbliche Besonderheiten, die ihn von *C. africana* und *C. albicans* unterschieden. Alle *C. africana*-Stämme wiesen nach 24 Stunden zunächst ein spärliches Wachstum ohne Farbentwicklung auf. Nach 48 Stunden hatten drei Kulturen (43 %) eine mittellila, drei (43 %) eine dunkellila und eine (14 %) eine dunkeltürkise Färbung entwickelt. Im Verlauf färbten sich weitere Stämme blau bzw. türkis ein, sodass sich nach 72 Stunden auf vier Agarplatten dunkelblaue (57 %), auf zwei dunkeltürkise (29 %) und auf einer dunkellila (14 %) Kolonien fanden. Die Farbe diffundierte bei sechs von sieben Stämmen ausgehend von der Kolonie in den umliegenden Agar und bildete einen Farbhof. Dunkeltürkis und Dunkelblau ähnelten sich stark und können deshalb zusammengefasst werden. Daraus

ergeben sich für die Messung nach 72 Stunden sechs dunkeltürkis-blaue Stämme (86 %) und ein (14 %) dunkellila gefärbter Stamm. Zusätzlich zeigten nach 48 Stunden fünf (71 %) und nach 72 Stunden alle Stämme (100 %) eine zipfelförmige Morphologie (siehe Abbildung 5.15).



**Abbildung 5.15** Zwei *C. africana*-Stämme (von oben nach unten) auf CandiSelect 4 nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

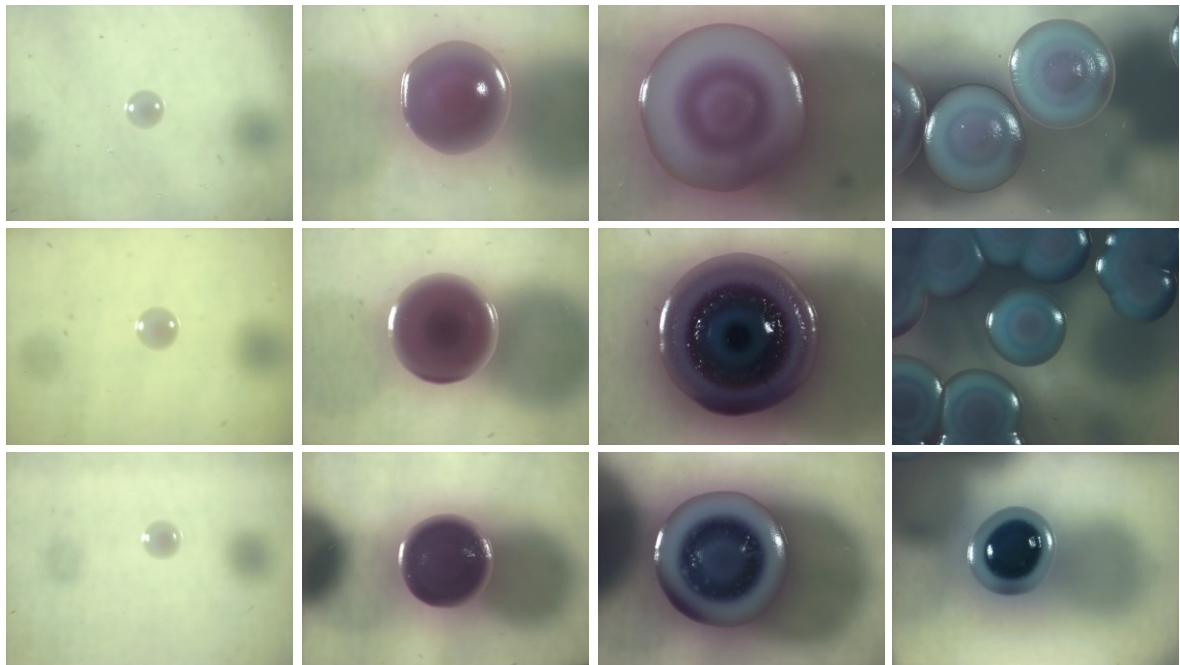
Bei *C. albicans* war schon nach 24 Stunden in 50 % der Fälle (16) ein helllila und in weiteren 50 % (16) ein mittellila Wachstum zu verzeichnen. Nach 48 Stunden lag ein Farbspektrum von Rosa bis Lila vor, mit einer helllila (3 %) gefärbten Hefe sowie acht mittelrosa (25 %), fünf dunkelrosa (16 %), sechs mittellila (19 %) und zwölf dunkellila gefärbten Hefen (37 %). Im Verlauf verblasste die Farbintensität leicht. Nach 72 Stunden fanden sich 25 helllila Stämme (78 %). Drei Stämme (9 %) wiesen weiter eine mittellila und vier (13 %) eine dunkellila Schattierung auf. Bei allen Hefen zeigte sich nach 48 und 72 Stunden eine lilafarbener Farbhof (siehe Abbildung 5.16).



**Abbildung 5.16** *C. albicans* auf CandiSelect 4 nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

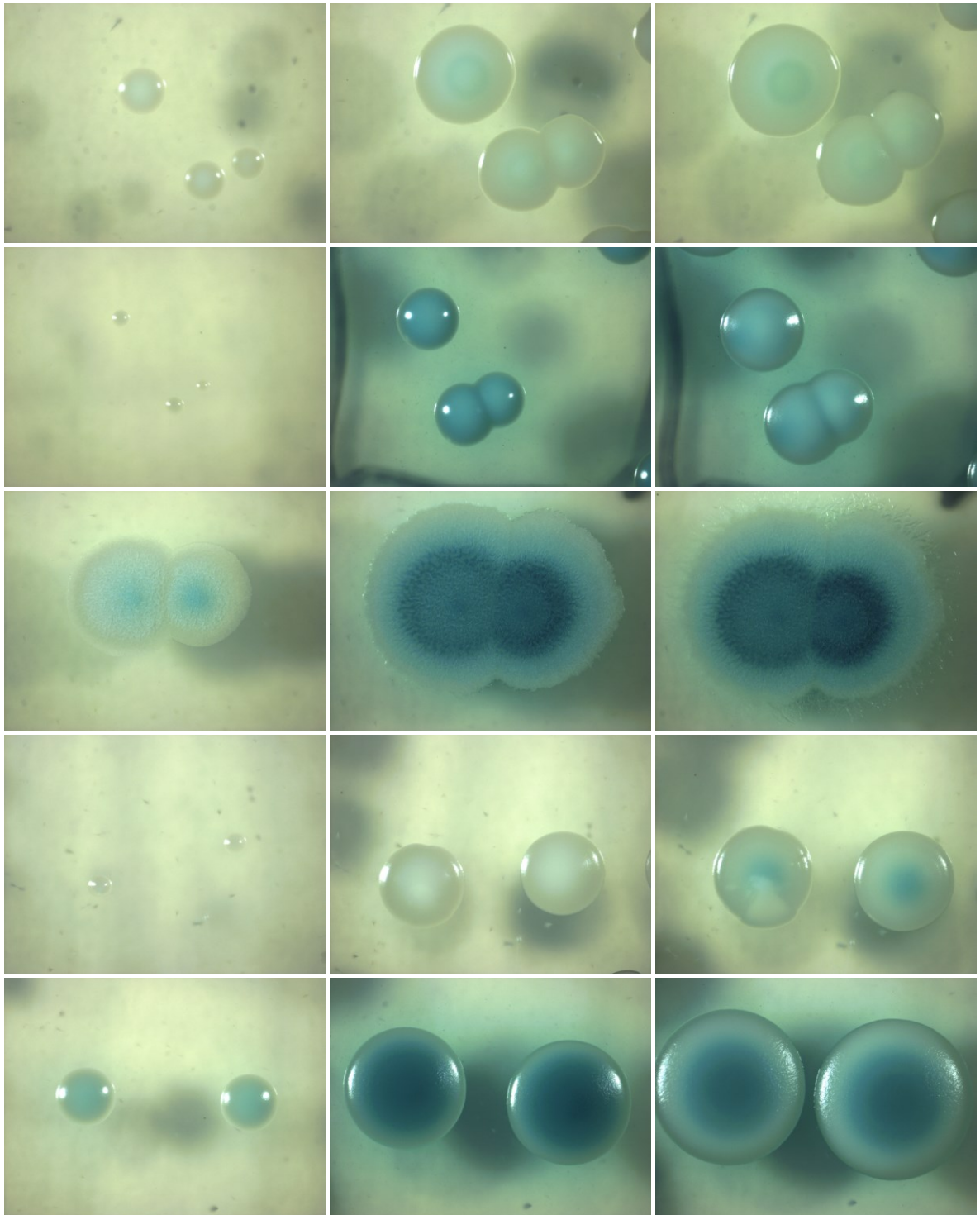
*C. dubliniensis* bildete zeitiger eine intensive Farbausprägungen als *C. africana*, jedoch später als *C. albicans*. Nach 24 Stunden war eine Kolonie (5 %) weiß geblieben. 13 (59 %) hatten eine hellrosa und acht eine helllila Farbe (36 %) entwickelt. Hellrosa und Helllila

waren nur im direkten Vergleich oder mit dem Pantone Matching System voneinander zu unterscheiden, weshalb sie zusammengefasst werden können. Nach 48 Stunden fanden sich sieben mittelrosa (32 %), vier helllila (18 %) und zehn mittellila Pilze (45 %) sowie ein dunkellila Pilz (5 %). Zusätzlich färbten sich auf einer Platte einige Kolonien dunkelblau. Dieses Phänomen trat nach 72 Stunden verstärkt auf. Es fanden sich auf einer Agarplatte Kolonien verschiedener Farben oder eine Kolonie trug zwei Farben. 21 Stämme (95 %) wiesen ein zweifarbiges Wachstum von mittellila/mitteltürkiser Färbung auf. Dabei war ein lila Zentrum ringförmig von einem türkisen Rand umgeben. Mit Ausnahme von drei der zweifarbig wachsenden Kulturen fanden sich auf den Agarplatten auch andersfarbige Kolonien. Zusätzlich zeigten sich bei 14 Stämmen mittellila Kolonien, bei einem dunkellila, bei einem weiteren dunkelblaue, bei einem dritten mittellila sowie dunkelblaue und bei einem vierten zweifarbig dunkeltürkise/dunkellila Kolonien. Ein Stamm (5 %) prägte ebenfalls ein zweifarbiges, ringförmig angeordnetes Muster aber mit einem dunkelblauen Zentrum und blass türkis- bis lilafarbenen Rand aus. Auffallend war außerdem, dass nach 48 Stunden bei allen Stämmen, genau wie bei *C. albicans*, ein Farbhof zu sehen war. Mit zunehmender Türkis-/Blaufärbung verschwand dieser jedoch (siehe Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17** Drei *C. dubliniensis*-Stämme (von oben nach unten) auf CandiSelect 4 nach 24 und 48 sowie, in zwei Aufnahmen verschiedener Kolonien desselben Stammes, nach 72 Stunden (von links nach rechts)

*C. glabrata* zeigte nach 24 Stunden noch keine Farbentwicklung. Auch nach 48 Stunden blieben zwei Stämme (33 %) weiß und vier (67 %) entwickelten eine hellgrüne/-türkise Färbung, die nach 72 Stunden alle Pilze annahmen (siehe Abbildung 5.18). Auch bei *C. guilliermondii* blieben vier Kolonien (57 %) zunächst weiß, während sich drei weitere (43 %) helltürkis färbten. Im Verlauf dunkelten alle Stämme nach, sodass nach 48 Stunden vier helltürkise (57 %) sowie drei mitteltürkise (43 %) und nach 72 Stunden sieben mitteltürkise Stämme (100 %) vorlagen (siehe Abbildung 5.18). Auffallend war dabei, dass nach 48 bzw. 72 Stunden bei drei Stämmen (43 %) ein kräftiger türkiser Farbhof vorlag. *C. krusei* zeigte bereits nach 24 Stunden auf vier Agarplatten eine Farbentwicklung zu Helltürkis und auf einer (20 %) zu Mitteltürkis. Nach 48 Stunden fanden sich bei allen Pilzen mitteltürkise Schattierungen, was sich auch nach 72 Stunden so darstellte. Bereits nach 24 Stunden fiel bei allen Stämmen die typische raue Morphologie auf (siehe Abbildung 5.18). Bei *C. parapsilosis* war nach 24 Stunden ein spärliches weißes Wachstum zu verzeichnen. Im Verlauf färbten sich 16 der 17 Stämme (94 %) hellgrün. Nach 72 Stunden waren weiterhin 13 Pilze (76 %) hellgrün und vier (24 %) helltürkis. Hellgrün und Helltürkis ließen sich nur im direkten Vergleich oder mit dem Pantone Matching System unterscheiden und können deshalb zusammengefasst werden. Das heißt alle Stämme prägten eine hellgrün/-türkise Färbung aus (siehe Abbildung 5.18). Nach 24 Stunden färbten sich drei *C. tropicalis*-Stämme (60 %) helltürkis und weitere zwei (40 %) mitteltürkis. Im Verlauf dunkelten die Farben nach, sodass nach 48 und 72 Stunden vier Agarplatten (80 %) mit mitteltürkisen und eine (20 %) mit dunkeltürkisen Kolonien bewachsen waren. Auch *C. tropicalis* bildete in vier von fünf Fällen einen Farbhof aus. Drei der fünf *C. tropicalis*-Stämme zeigten eine raue Oberfläche, wobei eine Hefe großflächige Kolonien, ähnlich denen von *C. krusei*, bildete (siehe Abbildung 5.18).



**Abbildung 5.18** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (von oben nach unten) auf CandiSelect 4 nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die in Tabelle 5.7 aufgeführten Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.8.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	<u>Hell-Türkis/Grün</u>		<u>Mittel-/Dunkel-Türkis</u>		<u>Türkis-blau</u>		<u>Lila</u>		<u>Rosa</u>		<u>Lila + Türkis</u>		<u>Weiß</u>	
	48h	72h	48h	72h	72h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	0	0	0	0	1	6	6	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (32)	0	0	0	0	0	0	19	32	13	0	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	0	0	0	0	0	1	15	0	7	0	0	21	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>C. guilliermondii</i> (7)	4	0	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (17)	16	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 5.7** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf CandiSelect 4

Statistisch fielen für CandiSelect 4 die eindeutigen Werte von *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* nach 72 Stunden auf, die auf eine Differenzierbarkeit der drei Subspezies hindeuteten. *C. africana* wies nach 48 bzw. 72 Stunden eine Sensitivität und Spezifität von 0,14/0,86 und 1/0,99 für die Farbe Dunkel-Türkisblau auf. Aufgrund des zipfelförmigen Wachstums ergab sich eine Sensitivität und Spezifität von 0,7/1 und je 1 nach 48/72 Stunden. Bei *C. albicans* fanden sich für die Farbe Lila nach 72 Stunden Werte von 1 und 0,99 für Sensitivität und Spezifität. Vom Hersteller wird für *C. albicans* eine Farbausprägung von Rosa bis Lila angegeben. Nach Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse von *C. albicans* für Rosa und Lila, lagen Werte von je 1 und 0,59/0,99 (48/72 Stunden) für Sensitivität und Spezifität vor. Das zweifarbige Wachstum Türkis/Lila von *C. dubliniensis* ergab nach 72 Stunden eine Sensitivität und Spezifität von 0,95 und 1. *C. glabrata* und *C. parapsilosis* bildeten nach 48 und 72 Stunden ausschließlich helltürkise/-grüne oder weiße Färbungen aus. Deshalb war trotz hoher Sensitivität und Spezifität von *C. parapsilosis* (48 Stunden) keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Subspezies möglich, was sich auch am niedrigen ppV von 0,2/0,38 (*C. glabrata*/*C. parapsilosis*) bemerkbar machte. *C. krusei* und *C. tropicalis* wiesen für Mittel-/Dunkeltürkis eine hohe Sensitivität und Spezifität von je 1 und 0,88 nach 48/72 Stunden auf. Der geringe ppV (je 0,38) deutete aber auf eine fehlende Differenzierbarkeit mittels Farbe hin. Unter Beachtung der typischen rauen Morphologie ergab sich für *C. krusei* jedoch eine Sensitivität und Spezifität von 1 und 0,99 bei einem ppV von 0,83. Durchgehend Werte von 1 lagen nicht vor, da ein *C. tropicalis*-Stamm eine Morphologie zeigte, die der von *C. krusei* stark ähnelte. *C. guilliermondii* nahm farblich eine Zwischenstellung ein, da er hell- bis mitteltürkise Kolonien ausbildete.

	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
Farbe/Spp.	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Hellettürkis/-grün</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	0,67	1	0,79	0,82	0,17	0,26	0,97	1	0,78	0,83
<i>C. guilliermondii</i>	0,57	0	0,79	0,76	0,17	0	0,96	0,91	0,77	0,7
<i>C. parapsilosis</i>	0,94	1	0,9	0,93	0,67	0,74	0,99	1	0,91	0,94
<b><u>Mittel-/Dunkel-Türkis</u></b>										
<i>C. guilliermondii</i>	0,43	1	0,89	0,89	0,23	0,41	0,95	1	0,86	0,9
<i>C. krusei</i>	1	1	0,88	0,88	0,29	0,29	1	1	0,88	0,88
<i>C. tropicalis</i>	1	1	0,88	0,88	0,29	0,29	1	1	0,88	0,88
<b><u>Dunkel-Türkis/Blau</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,14	0,86	1	0,99	1	0,86	0,94	0,99	0,94	0,98
<i>C. dubliniensis</i>	0	0,05	0,99	0,92	0	0,14	0,78	0,78	0,77	0,73
<b><u>Lila</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,86	0,14	0,64	0,66	0,15	0,03	0,98	0,91	0,65	0,62
<i>C. albicans</i>	0,59	1	0,7	0,99	0,48	0,97	0,79	1	0,66	0,99
<i>C. dubliniensis</i>	0,68	0	0,68	0,58	0,38	0	0,89	0,68	0,68	0,46
<b><u>Rosa</u></b>										
<i>C. albicans</i>	0,41	0	0,9	1	0,65	-	0,77	0,68	0,74	0,68
<i>C. dubliniensis</i>	0,32	0	0,84	1	0,35	-	0,81	0,78	0,72	0,78
<b><u>Zweifarbige Türkis + Lila</u></b>										
<i>C. dubliniensis</i>	0	0,95	1	1	-	1	0,78	0,99	0,78	0,99
<b><u>Weiß</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	0,33	0	0,99	1	0,67	-	0,96	0,94	0,95	0,94
<i>C. parapsilosis</i>	0,06	0	0,98	1	0,33	-	0,84	0,83	0,82	0,83
<b><u>Morphologische Besonderheiten</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,71	1	1	1	1	1	0,98	1	0,98	1
<i>C. krusei</i>	1	1	0,99	0,99	0,83	0,83	1	1	0,99	0,99

**Tabelle 5.8** Statistische Auswertung der auf CandiSelect 4 ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden

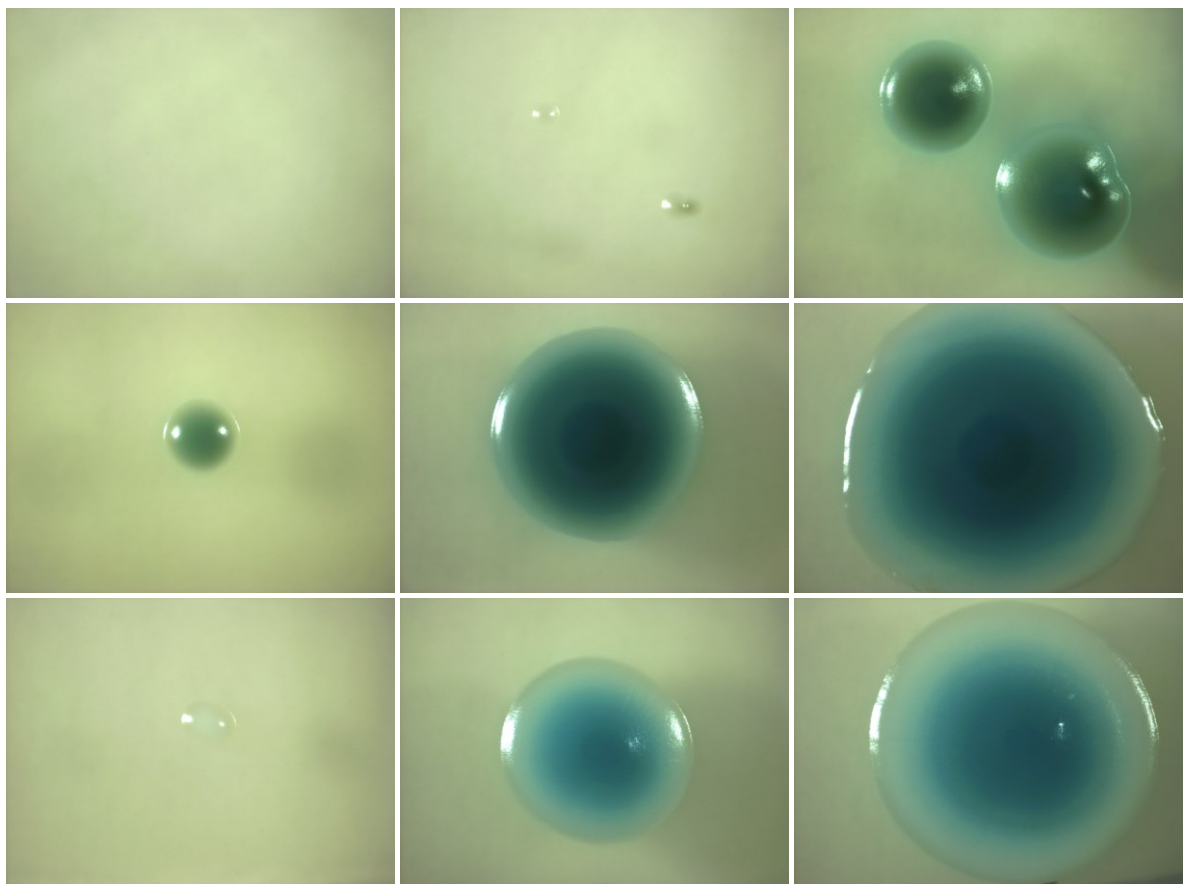
### 5.5 Candida-Ident-Agar

Bei der Anzucht der *Candida*-Spezies auf Candida-Ident-Agar zeigte sich nach 24, 48 und 72 Stunden eine farbliche Zweiteilung. Alle *C. africana*-, *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämme wiesen verschiedenen Schattierungen von Grün oder Türkis auf. *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* hingegen wuchsen in Weiß und



Beigetönen. *C. tropicalis* nimmt eine Sonderstellung ein, da er zunächst in beigefarbenen Färbungen wuchs, die sich im Verlauf in Grün- und Türkistöne umwandelten.

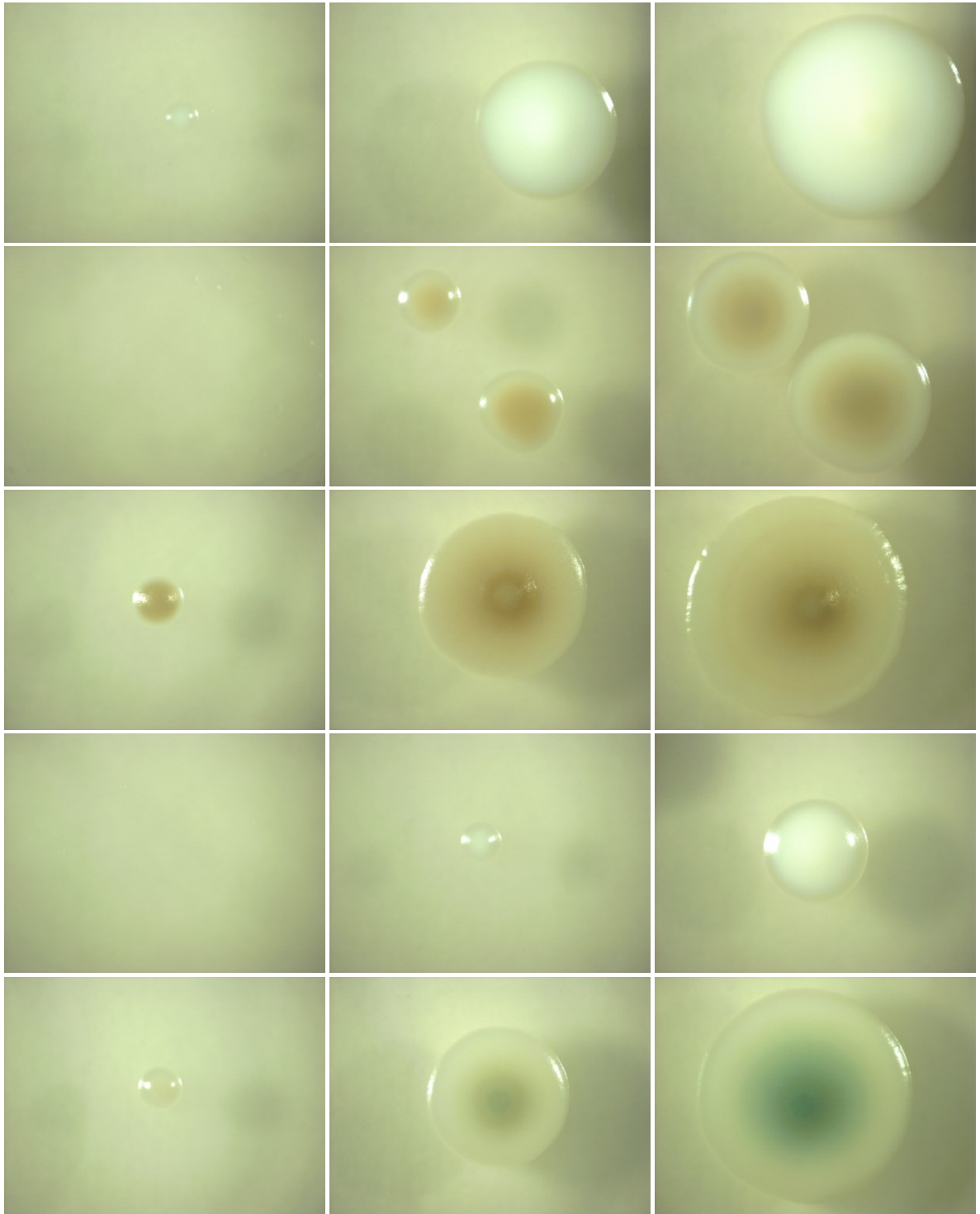
Nach 24 Stunden wies *C. africana* ein spärliches, farbloses bzw. kein Wachstum auf. Erst nach 48 Stunden färbten sich vier Stämme (57 %) mittelgrün. Im Verlauf zeigten alle Kolonien eine dunkelgrüne Farbe (siehe Abbildung 5.19). Morphologisch fiel eine zipfelige Kolonieform auf, die nach 48 Stunden bei einem Stamm (14 %) und nach 72 Stunden bei allen Stämmen (100 %) vorlag. Alle *C. albicans*-Stämme entwickelte bereits nach 24 Stunden eine Färbung. Davon war einer mittelgelb (3 %), zwei hellgrün (6 %), 26 mittelgrün (88 %) und einer mitteltürkis (3 %) gefärbt. Nach 48 Stunden zeigten sich auf vier Agarplatten (12,5 %) mittelgrüne und auf 28 (87,5 %) dunkelgrüne Schattierungen, die sich nach 72 Stunden auf 14 Platten zu mitteltürkisen (44 %) und auf 18 zu dunkeltürkisen Färbungen umwandelten (siehe Abbildung 5.19). *C. dubliniensis* wies nach 24 Stunden nur ein spärliches, farbloses Wachstum auf. Nach 48 Stunden bildeten zwei Stämme (9 %) eine mittelgrüne, vier (18 %) eine helltürkise und 16 (73 %) eine mitteltürkise Farbe aus. Im Verlauf intensivierte sich die Färbung aller Pilze, sodass nach 72 Stunden ausschließlich mitteltürkise Kolonien vorlagen (siehe Abbildung 5.19).



**Abbildung 5.19** *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* (von oben nach unten) auf Candida-Ident-Agar nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)



*C. glabrata* bildete nach 24, 48 und 72 Stunden makroskopisch ausschließlich weiße Kolonien. Auch *C. guilliermondii* wuchs nach 24 Stunden in weißer Farbe, insgesamt aber sehr spärlich. Nach 48 Stunden blieben fünf Pilze (72 %) weiterhin weiß, einer (14 %) färbte sich hellgelb und ein weiterer (14 %) gelbbraun. Nach 72 Stunden fanden sich ein weißer Stamm (14 %), drei hellgelbe (43 %), ein hellbrauner (14 %) und zwei gelbbraune Stämme (29 %) (siehe Abbildung 5.20). Alle *C. krusei*-Stämme wiesen nach 24 und 48 Stunden eine gelbbraune Färbung auf, die sich nach 72 Stunden zu einem Mittelbraun änderte. Sie zeigten nicht das typische raue Wachstum sondern in vier von fünf Fällen eine glatte, großflächige Morphologie (siehe Abbildung 5.20). Bei *C. parapsilosis* fand sich nach 24, 48 und 72 Stunden ein spärliches weißes Wachstum. Auf vier Agarplatten wuchs nichts an. *C. tropicalis* bildete nach 24 Stunden auf vier Agarplatten (80 %) weiße Kolonien mit spärlichem Wachstum sowie auf einer (20 %) hellgelbe Kolonien. Nach 48 Stunden hatten sich bei vier Stämmen (80 %) eine gelbbraune und bei einem (20 %) eine hellgrüne Färbung entwickelt. Die Farben intensivierten sich weiter, sodass nach 72 Stunden vier mittelgrüne (80 %) und ein mitteltürkiser Pilz (20 %) vorlagen (siehe Abbildung 5.20). Die verschiedenen Gelb- und Brauntöne der Subspezies *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. tropicalis* ähneln sich stark und können als Beige zusammengefasst werden.



**Abbildung 5.20** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (von oben nach unten) auf Candida-Ident-Agar nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die in Tabelle 5.9 aufgeführten Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.10.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	<u>Grün</u>		<u>Türkis</u>		<u>Beige</u>		<u>Weiß</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	4	7	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (32)	32	0	0	32	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	2	0	20	22	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	0	0	0	0	0	0	6	6
<i>C. guilliermondii</i> (7)	0	0	0	0	2	6	5	1
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	0	0	5	5	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0	0	0	0	0	0	13	13
<i>C. tropicalis</i> (5)	1	4	0	1	4	0	0	0

**Tabelle 5.9** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf Candida-Ident-Agar

Die statistischen Ergebnisse der Anzucht auf Candida-Ident-Agar wiesen auf eine Differenzierbarkeit von *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. africana* hin. Für *C. albicans* lag nach 48 Stunden eine Sensitivität/Spezifität von 1/0,9 für Grün und für *C. dubliniensis* von 0,91/1 für Türkis vor. Die Färbung Grün von *C. africana* wies eine Sensitivität und Spezifität von 0,57/1 und 0,63/0,96 (48/72 Stunden) auf und unterschied diesen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* nach 72 Stunden. Der ppV von 0,64 entstand aufgrund der Grünfärbung von 80 % der *C. tropicalis*-Stämme nach 72 Stunden. *C. tropicalis* wies zu diesem Zeitpunkt für Grün eine Sensitivität und Spezifität von 0,8 und 0,93 auf. *C. africana* zeigte aber eine morphologische Eigenschaft, die ein Alleinstellungsmerkmal darstellte. Diese Subspezies bildete zipfelförmig Kolonieförmungen und erreichte dadurch eine Sensitivität und Spezifität von 0,14/1 und je 1 (48/72 Stunden). *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. tropicalis* bildeten verschiedene Schattierungen von Weiß bis Beige aus, sodass bei hoher Spezifität und Sensitivität für Beige nur geringe positiv prädikative Vorhersagewerte vorlagen und somit keine Differenzierung möglich war.

Farbe/Spp.	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Grün</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,57	1	0,63	0,96	0,1	0,64	0,95	1	0,62	0,96
<i>C. albicans</i>	1	0	0,9	0,84	0,82	0	1	0,64	0,93	0,58
<i>C. dubliniensis</i>	0,09	0	0,53	0,86	0,05	0	0,68	0,76	0,44	0,67
<i>C. tropicalis</i>	0,2	0,8	0,6	0,93	0,03	0,36	0,94	0,99	0,58	0,92
<b><u>Türkis</u></b>										
<i>C. albicans</i>	0	1	0,71	0,67	0	0,58	0,6	1	0,49	0,77
<i>C. dubliniensis</i>	0,91	1	1	0,58	1	0,4	0,98	1	0,98	0,67
<i>C. tropicalis</i>	0	0,2	0,79	0,44	0	0,02	0,94	0,91	0,75	0,43
<b><u>Beige</u></b>										
<i>C. guilliermondii</i>	0,29	0,86	0,9	0,95	0,18	0,55	0,94	0,99	0,86	0,94
<i>C. krusei</i>	1	1	0,94	0,94	0,55	0,55	1	1	0,94	0,94
<i>C. tropicalis</i>	0,8	0	0,93	0,92	0,36	0	0,99	0,95	0,92	0,87
<b><u>Weiß</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	1	1	0,81	0,86	0,25	0,32	1	1	0,82	0,87
<i>C. guilliermondii</i>	0,71	0,14	0,8	0,86	0,21	0,07	0,97	0,93	0,79	0,81
<i>C. parapsilosis</i>	0,76	0,76	0,87	0,92	0,54	0,65	0,95	0,95	0,85	0,89
<b><u>Morphologische Besonderheiten</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,14	1	1	1	1	1	0,94	1	0,94	1

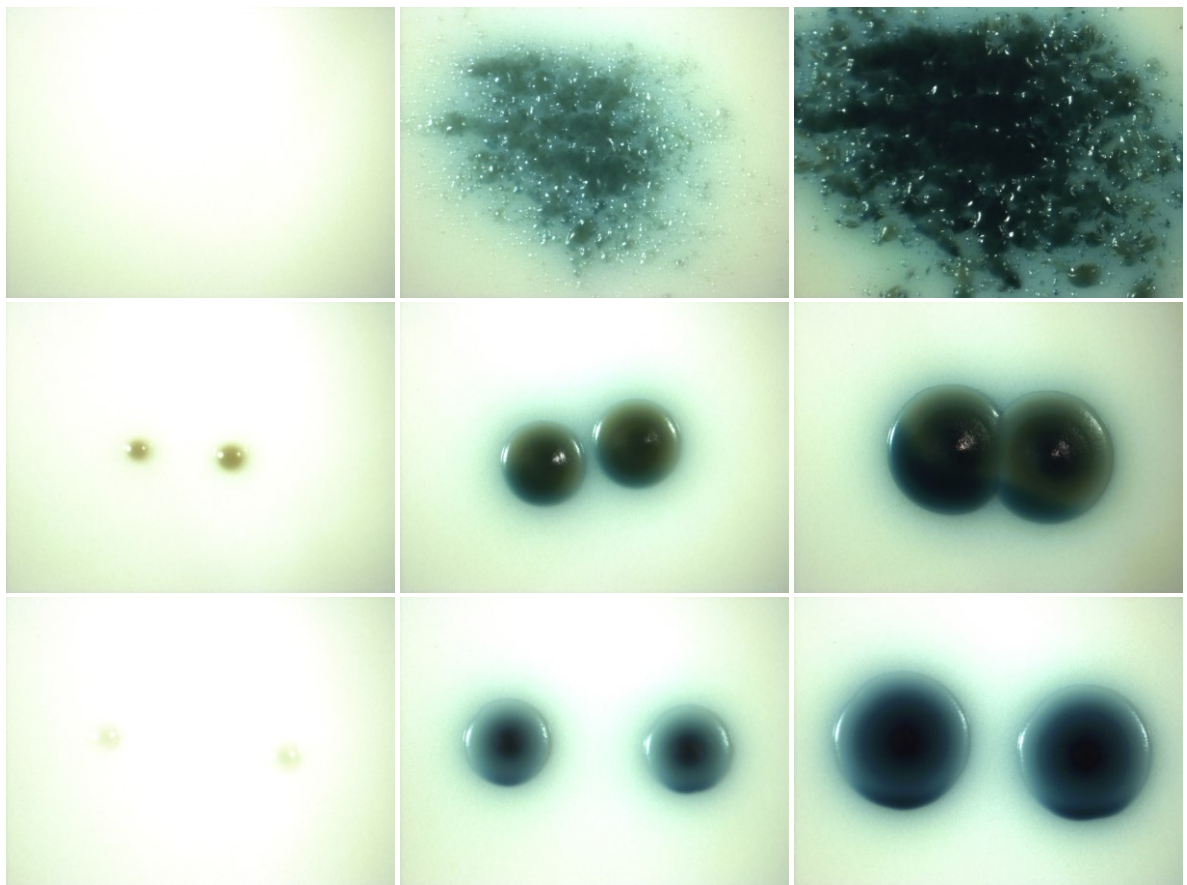
**Tabelle 5.10** Statistische Auswertung der auf Candida-Ident-Agar ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden

## 5.6 Brilliance Candida

Die Farbausprägungen der *Candida*-Spezies auf Brilliance Candida wiesen eine Dreiteilung auf. *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* wuchsen in grünen und türkis-blauen Farben. *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* prägten Gelb- und Brauntöne aus. Ein anderes Verhalten zeigte *C. tropicalis*, bei dem sich lila und türkise Färbungen fanden.

*C. africana* wuchs bis auf einen Stamm (14 %), der nach 48 und 72 Stunden ein mitteltürkises Wachstum zeigte, jedoch keine separaten Einzelkolonien bildete, auf Brilliance Candida nicht an (siehe Abbildung 5.21). Nach 24 Stunden fanden sich bei *C. albicans* eine hellgelbe Kolonie (3 %), vier hellgrüne Kolonien (13 %), 26 olivgrüne Kolonien (81 %) und eine helltürkisgrüne Kolonie (3 %). Nach 48 Stunden hatten sich drei Pilze (9,5 %) mitteltürkisgrün, 19 (59,5 %) dunkeltürkisgrün und zehn (31 %) zweifarbig mittelolivgrün/mitteltürkis gefärbt. Im Verlauf entwickelten sich bis auf eine Kolonie

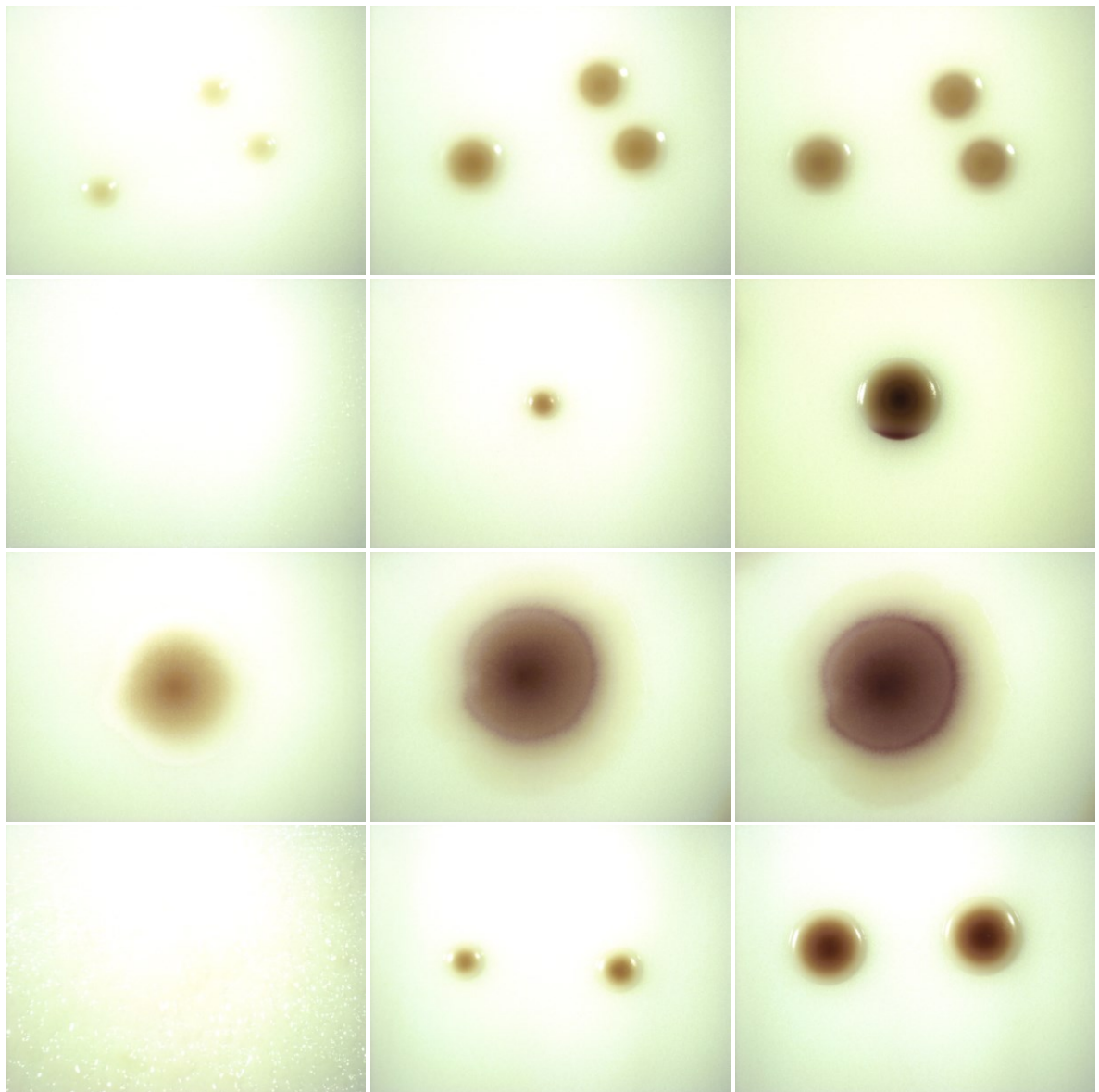
(3 %), die von dunkelgrüner Farbe war, alle zweifarbig. Zwei Stämme (6 %) blieben mittelolivgrün/mitteltürkis, 29 intensivierten sich zu dunkelolivgrün/ dunkeltürkis (siehe Abbildung 5.21). *C. dubliniensis* entwickelte nach 24 Stunden auf fünf Agarplatten weiße (23 %) und auf 17 helltürkise Kolonien (77 %). 24 Stunden später hatten sich ein Pilz (5 %) mittelgrün und 21 Pilze (95 %) dunkeltürkisn gefärbt. Nach 72 Stunden prägten alle bis auf eine Kolonie (5 %), die dunkelblau gewachsen war, eine dunkeltürkise Farbe aus (siehe Abbildung 5.21). Dunkeltürkis und Dunkelblau können zusammengefasst werden, da sie nur im direkten Vergleich oder mit dem Pantone Matching System voneinander zu unterscheiden waren.



**Abbildung 5.21** *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf Brilliance Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Alle *C. glabrata*-Stämme wiesen nach 24 Stunden ein hellgelbe Färbung auf, die sich im Verlauf zu einem Gelbbraun entwickelte. Nach 72 Stunden blieben vier Pilze (67 %) weiterhin gelbbraun und zwei färbten sich mittelbraun (siehe Abbildung 5.22). *C. guilliermondii* bildete nach 24 Stunden auf vier Platten weiße (57 %) und auf drei helllila Kolonien (43 %). Nach 48 Stunden hatten vier Stämme (57 %) eine mittelbraune Schattierung angenommen und drei weitere (43 %) eine dunkel-rotbraune. In den folgenden 24 Stunden dunkelten die Farbausprägungen aller Stämme nach, sodass fünf

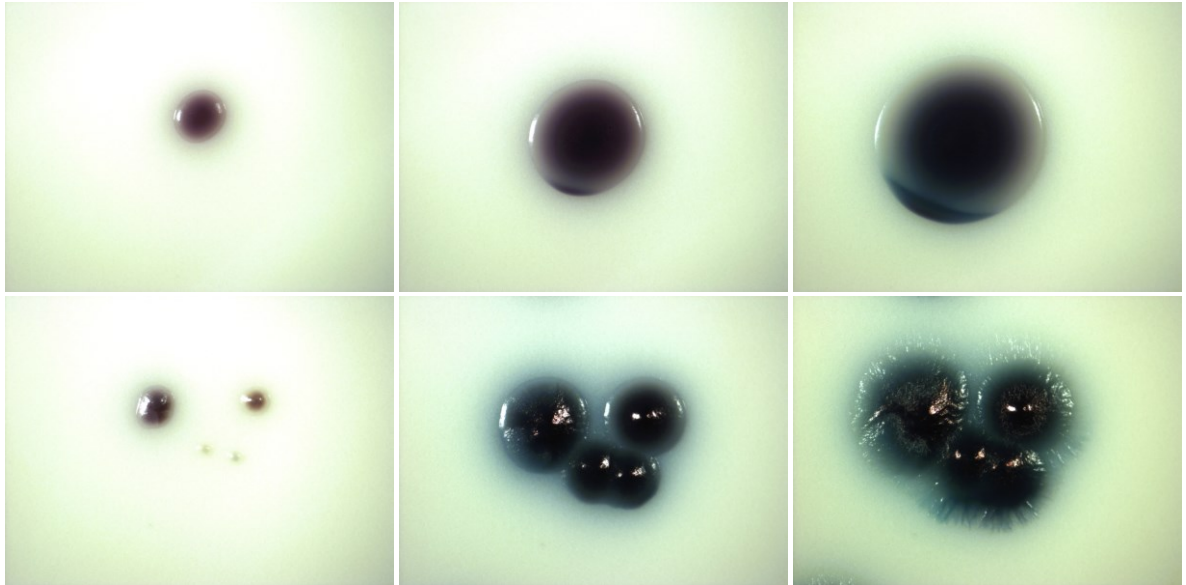
dunkelbraune (71 %) und zwei dunkel-rotbraune (29 %) Färbungen vorlagen (siehe Abbildung 5.22). *C. krusei* präsentierte sich nach 24 und 48 Stunden hellbraun. Nach 72 Stunden intensivierten alle Stämme ihre Farbgebung und es lagen vier mittelbraune (80 %) und ein dunkelbrauner (20 %) Pilz vor (siehe Abbildung 5.22). Alle Stämme dieser Subspezies zeigten die typische raue Morphologie. Bei *C. parapsilosis* fand sich zunächst ein spärliches, weißes Wachstum. Nach 48 Stunden entwickelten sich ein Stamm hellgelb bis beige (6 %), vier gelbbraun (23 %), einer hellbraun (6 %), und zehn mittelbraun (59 %). Wie bei *C. guilliermondii* und *C. krusei* dunkelten die Kolonien innerhalb der nächsten 24 Stunden nach und präsentierten sich als zwei hellbraune (12 %), zwei mittelbraune (12 %) und 13 dunkelbraune Hefen (76 %) (siehe Abbildung 5.22).



**Abbildung 5.22** *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* (von oben nach unten) auf Brilliance Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)



Nach 24 Stunden wiesen drei *C. tropicalis*-Stämme (60 %) eine mittellila und zwei (40 %) eine dunkellila Färbung auf. Im Verlauf intensivierten sich die Farben, sodass nach 48 und 72 Stunden vier Agarplatten (80 %) dunkellila bewachsen waren. Ein Pilz (20 %) färbte sich nach 48 Stunden dunkeltürkis und behielt diese Farbe bis zur letzten Messung bei (siehe Abbildung 5.23).



**Abbildung 5.23** Zwei *C. tropicalis*-Stämme (von oben nach unten) auf Brilliance Candida nach 24, 48 und 72 Stunden (von links nach rechts)

Für die statistische Auswertung wurden die in Tabelle 5.11 aufgeführten Farbschattierungen und Werte genutzt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Ergebnisse zeigt Tabelle 5.12.

Subspezies (Anzahl der Stämme)	<u>Grün</u>		<u>Türkis- Blau</u>		<u>Grün + Türkis</u>		<u>Lila</u>		<u>Beige/ Braun</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<i>C. africana</i> (7)	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (32)	0	1	22	0	10	31	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (22)	1	0	21	22	0	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (6)	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6
<i>C. guilliermondii</i> (7)	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7
<i>C. krusei</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	16	17
<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	1	1	0	0	4	4	0	0

**Tabelle 5.11** Färbung der untersuchten *Candida*-Stämme auf Brilliance Candida

Auf Brilliance Candida ließen sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* nach 72 Stunden klar voneinander abgrenzen. *C. albicans* zeigte mit einer Sensitivität und Spezifität von 0,31/0,97 und je 1 zweifarbig olivgrün/türkisfarbene Kolonien (48/72 Stunden). *C. dubliniensis* wies für die Farbe Türkis/Blau eine Sensitivität und Spezifität von 0,95/1 und 0,7/0,97 (48/72 Stunden) auf. Zwischen *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* war keine farbliche Differenzierung möglich, da alle Subspezies Kolonien mit brauner oder beiger Färbung ausbildeten. Das spiegelte sich in den statistischen Ergebnissen wieder. *C. krusei* konnte aufgrund der rauen Morphologie jedoch eindeutig identifiziert werden und wies dadurch eine Sensitivität und Spezifität von 1 nach 48 und 72 Stunden auf. *C. tropicalis* unterschied sich mit einer Sensitivität und Spezifität von 0,8 und 1 nach 48 und 72 Stunden gegenüber allen anderen getesteten Subspezies durch die Ausbildung lilafarbener Kolonien.

Farbe/Spp.	<u>Sensitivität</u>		<u>Spezifität</u>		<u>ppV</u>		<u>npV</u>		<u>Effektivität</u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<b><u>Grün</u></b>										
<i>C. albicans</i>	0	0,03	0,99	1	0	1	0,68	0,69	0,67	0,69
<i>C. dubliniensis</i>	0,05	0	1	0,99	1	0	0,79	0,78	0,79	0,77
<b><u>Türkis/Blau</u></b>										
<i>C. africana</i>	0,14	0,14	0,53	0,76	0,02	0,04	0,89	0,92	0,5	0,71
<i>C. albicans</i>	0,69	0	0,67	0,65	0,49	0	0,82	0,58	0,67	0,45
<i>C. dubliniensis</i>	0,95	1	0,7	0,97	0,47	0,92	0,98	1	0,75	0,98
<i>C. tropicalis</i>	0,2	0,2	0,55	0,76	0,02	0,04	0,93	0,95	0,53	0,73
<b><u>Zweifarbige Grün/Türkis</u></b>										
<i>C. albicans</i>	0,31	0,97	1	1	1	1	0,76	0,99	0,78	0,99
<b><u>Braun</u></b>										
<i>C. glabrata</i>	1	1	0,69	0,69	0,17	0,17	1	1	0,71	0,71
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	0,7	0,7	0,2	0,2	1	1	0,72	0,72
<i>C. krusei</i>	1	1	0,69	0,69	0,14	0,14	1	1	0,7	0,7
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,79	0,79	0,49	0,49	1	1	0,82	0,82
<b><u>Lila</u></b>										
<i>C. tropicalis</i>	0,8	0,8	1	1	1	1	0,99	0,99	0,99	0,99
<b><u>Morphologische Besonderheiten</u></b>										
<i>C. krusei</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Tabelle 5.12** Statistische Auswertung der auf Brilliance Candida ausgeprägten Färbungen nach 48 und 72 Stunden



## 6 Diskussion

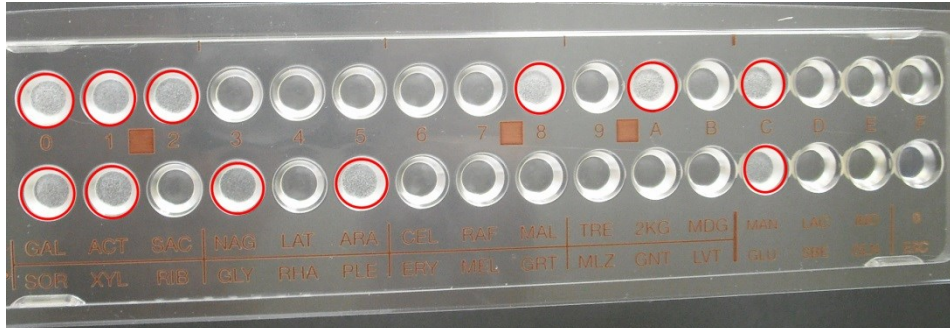
Ziel der Untersuchungen war es, sechs chromogene Nährmedien auf ihre Fähigkeit zu testen, häufig auftretende, pathogene *Candida*-Spezies zu detektieren und voneinander zu differenzieren. Dafür wurden zunächst 107 Candidastämme mittels morphologischer, biochemischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Methoden zur eindeutigen Identifizierung getestet. Es konnten 101 Stämme ermittelt werden, die als richtig positive Proben in die Testreihe eingeschlossen wurden.

### 6.1 Identifizierung der Pilzstämme

#### 6.1.1 API ID 32 C-System

Die Identifizierung der Hefen erfolgte mit Hilfe des API ID 32 C-Systems. Im System sind Referenzen der Assimilationsmuster von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* hinterlegt, sodass eine Erkennung dieser Subspezies potenziell möglich war. Bei drei der 101 Stämme, die in die Studie eingeschlossen wurden, konnte jedoch keine hundertprozentig sichere Bestimmung erfolgen. Durch die eindeutigen Ergebnisse der weiteren Identifizierungstests war eine sichere Zuordnung zu einer Subspezies aber möglich. Es handelt sich dabei um einen *C. albicans*-Stamm, der mit der Angabe ‚Profil inakzeptabel‘ als *Candida sake* (*C. sake*) oder *C. albicans* erkannt wurde, sowie zwei *C. dubliniensis*-Stämme, die mit der Angabe ‚Gute Identifizierung auf Genusebene‘ als *C. dubliniensis* oder *C. albicans* getestet wurden. Von den sechs Stämmen, die nicht in die Versuchsreihe aufgenommen werden konnten, wurde einer ausgeschlossen, da das API ID 32 C-System und der Reis-Agar diesen Stamm als *C. dubliniensis* identifizierten, die mikrobiologischen Untersuchungen und die MALDI-TOF MS diesen aber als *C. albicans* testeten. Zwei Kulturen, die sich auf den chromogenen Medien als Mischkulturen darstellten, konnten auf Reis-Agar nicht als solche erkannt werden. Das Assimilationsmuster von *C. africana* kann vom Mini-API-System nicht ausgewertet werden und wurde als *C. sake* missinterpretiert. Ähnliche Beobachtungen machten Alonso-Vargas et al. (2008) sowie Yazdanpanah und Khaithir (2014). Es fiel auf, dass alle untersuchten *C. africana*-Stämme bei visuellem Ablesen der Teststreifen ein von *C. sake* und *C. albicans* verschiedenes Assimilationsmuster zeigten, das in Abbildung 6.1 zu sehen ist. Diese Stämme waren in der Lage, Galaktose, Cycloheximid, Saccharose, Maltose, Kalium 2-Ketoglukonat, Mannit, Sorbit, Xylose, Palatinose und Glukose zu verstoffwechseln. Außerdem wiesen sechs der sieben getesteten Hefen die Fähigkeit auf, Glycerol abzubauen. Kein Wachstum zeigte sich in den

Vertiefungen, die N-Acetyl-Glukosamin, Milchsäure, Arabinose, Cellobiose, Raffinose, Trehalose, Methyl- $\alpha$ D-Glukopyranosid, Lactose, Inosit, Ribose, Rhamnose, Erythrit, Melibiose, Natrium Glukuronat, Melezitose, Kalium Glukonat, Levulinsäure, Sorbose und Glukosamin enthielten.



**Abbildung 6.1** ID32 C-Testergebnis eines *C. africana*-Stammes

Damit unterscheiden sich die angezüchteten *C. africana*-Stämme von *C. sake* durch die Fähigkeit zur Assimilation von Cycloheximid und die fehlende Verstoffwechselung von N-Acetyl-Glukosamin, Trehalose und Raffinose. Große Ähnlichkeit besteht auch zu *C. albicans*, der im Gegensatz zu *C. africana* in der Lage ist, N-Acetyl-Glukosamin, Milchsäure, Trehalose, Methyl-  $\alpha$ D-Glukopyranosid und Glukosamin abzubauen, jedoch nicht Glycerol (vergleiche hierzu Tabelle 9.1 Assimilationsmuster verschiedener *Candida*-Spezies). Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Wichtige Charakteristika wie die fehlende Fähigkeit zur Verstoffwechselung von Trehalose, Glukosamin und N-Acetyl-Glukosamin ermittelten unter anderem Al-Hedaithy und Fotedar (2002) sowie Sharma et al. (2014). Tietz et al. (2001) beschreiben umfassend das Assimilationsmuster von *C. africana*. Dieses unterscheidet sich für den Ringversuchsstamm RV 01/05 nicht von den Ergebnissen dieser Untersuchungen. Der Stamm ATTC MYA 2669 und die fünf Stämme aus Patientenproben differieren lediglich durch die Fähigkeit zum Abbau von Glycerol (siehe Tabelle 9.1).

Die ermittelten Daten zeigen, dass eine sichere und korrekte Identifizierung der 107 getesteten Stämme mit Hilfe des API ID 32 C-Systems mit einer Sensitivität von 0,89 möglich war. Eine ähnliche Sensitivität von 0,85 beschreiben Seyfarth et al. (2012). Es wurden aber auch deutlich abweichende Werte von 0,98 (Durán-Valle et al. 2014) oder 0,64 (Verweij et al. 1999) gefunden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2.

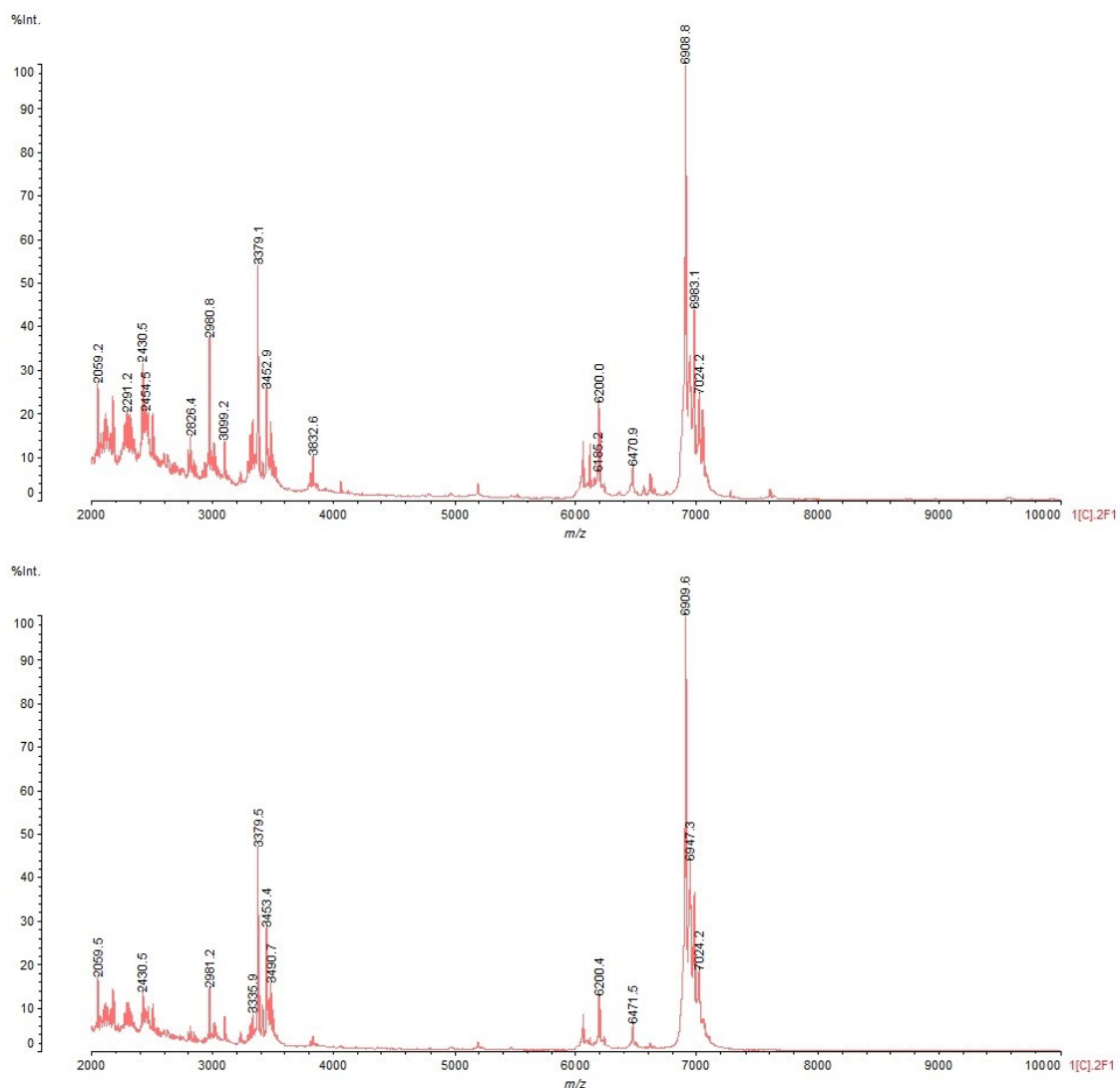
### 6.1.2 Reis-Agar

Die Bestimmung der *Candida*-Spezies mit Hilfe der Anzucht auf Reis-Agar erfolgte für alle *C. africana*-Stämme sowie für die *C. albicans*-, *C. dubliniensis*-, *C. glabrata*- und *C. krusei*-Stämme, die in den anderen Identifizierungstests nicht übereinstimmende Ergebnisse aufwiesen. Von den 101 Subspezies, die in die Studie eingeschlossen wurden, wurden 22 Stämme getestet. Davon zeigten 15 subspeziesstypische Wachstumsmuster (vergleiche Tabelle 4.3). Die sieben *C. africana*-Stämme wiesen Wachstumseigenschaften auf, wie sie auch von Tietz et al. (2001) beschrieben werden. Das Bild war geprägt von ovalären Blastosporen und reichlich langgestrecktem, schlankem, z.T. lockigem Pseudomycel. Im Gegensatz zum Wuchsbild der *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämme fanden sich keine Chlamydosporen. Von den sechs Stämmen, die nicht in die Testreihe aufgenommen wurden, wurden vier Stämme u.a. aufgrund eines mit Sequenzierung und MALDI-TOF MS inkongruenten Reis-Agarbefundes ausgeschlossen. Darunter befanden sich zwei *C. albicans*-Stämme, die keine Chlamydosporenbildung aufwiesen. Dieses Charakteristikum kann bei *C. albicans*-Stämmen vorkommen, erlaubt aber keine sichere Differenzierung gegenüber anderen *Candida*-Spezies. Ein weiterer *C. albicans*-Stamm zeigte auf Reis-Agar und im API ID 32 C-Befund die Eigenschaften von *C. dubliniensis*. Der vierte *C. albicans*-Stamm präsentierte ein Wachstumsmuster ähnlich dem von *C. tropicalis* oder *C. parapsilosis*. Auf den chromogenen Medien stellten sich zwei Proben als Mischkulturen dar. Davon wurde eine auf Reis-Agar getestet, konnte aber nicht als solche identifiziert werden.

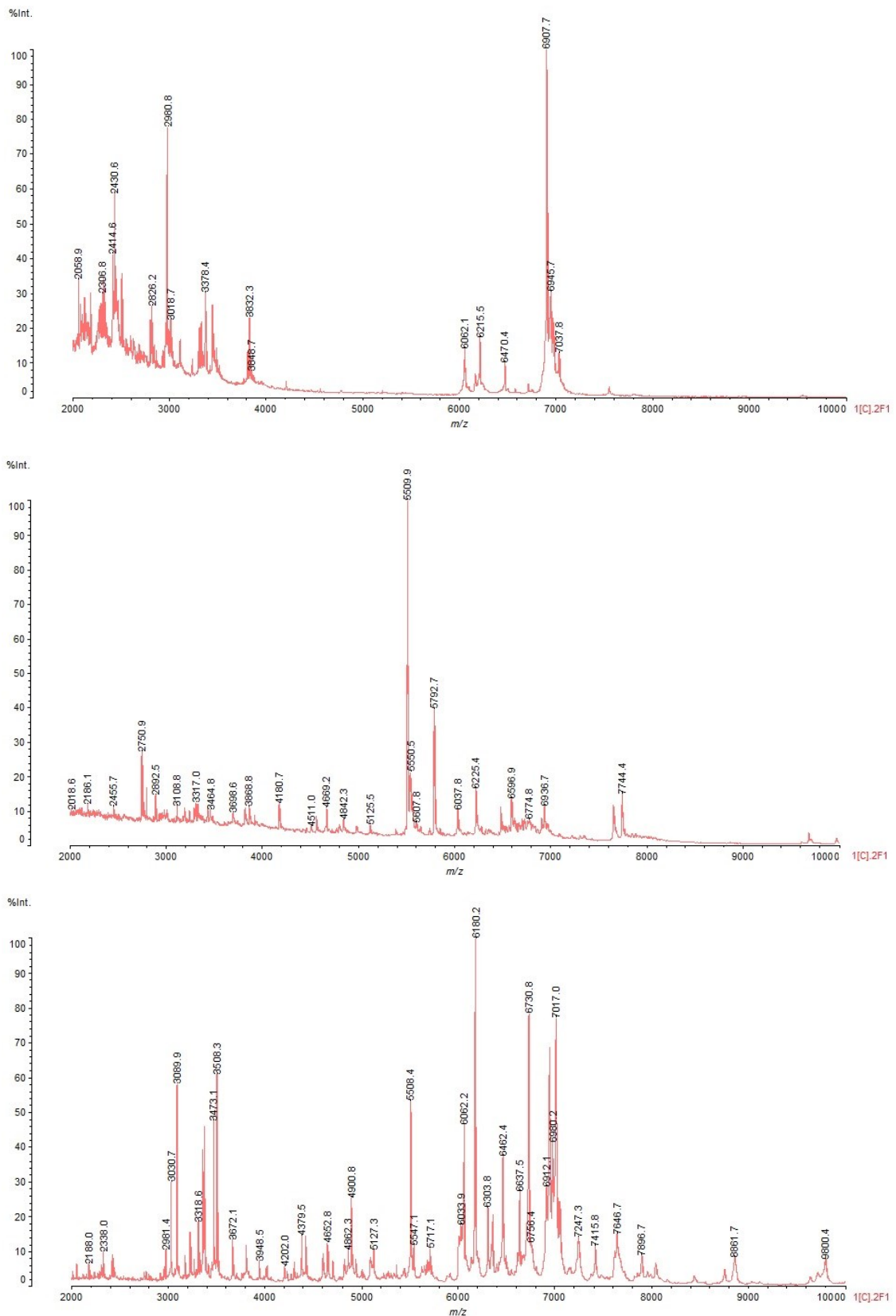
Die Gesamtsensitivität der Identifizierung auf Reis-Agar betrug 0,89. Die Sensitivität für *C. albicans* lag dabei nur bei 0,64, was den Untersuchungsergebnissen von Pasligh et al. (2010), Warwood und Blazvic (1977) sowie Rosenthal und Furnari (1958) widerspricht, die Werte von 0,97 – 1 ermittelten. Auffallend war, dass drei der fünf fehlinterpretierten Stämme keine Chlamydosporen bildeten, vom API ID 32 C-System, der MALDI-TOF MS und der Sequenzierung jedoch als *C. albicans* erkannt wurden. Werden die beiden Stämme, die ein *C. albicans*-ähnliches Bild ohne Chlamydosporen zeigten, als *C. albicans* gewertet, ergibt sich eine Sensitivität von 0,79. Alle weiteren getesteten Subspezies erreichten eine Sensitivität von 1. Diese schließt *C. dubliniensis* ein, der im Gegensatz dazu von Pasligh et al. (2010) nur mit einer Sensitivität von 0,44 differenziert werden konnte. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2.

### 6.1.3 MALDI- TOF Massenspektrometrie

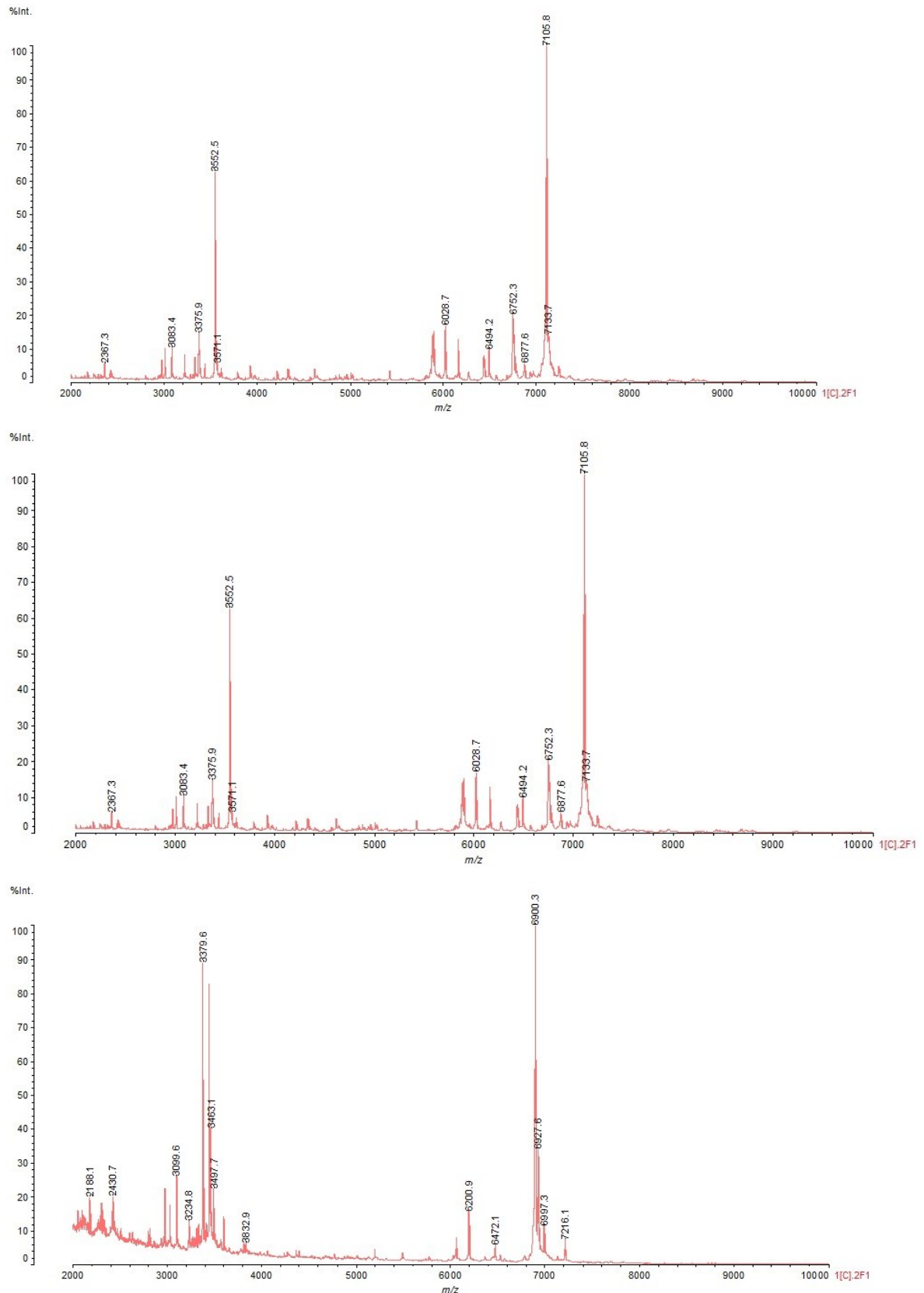
Zur eindeutigen Identifizierung wurden die *Candida*-Spezies mit Hilfe der MALDI-TOF MS (Axima/SARAMIS-System) bestimmt. Dabei wurden 98 der 101 Stämme, die in die Versuchsreihe aufgenommen wurden, sowie sechs Stämme, die nicht eingeschlossen wurden, getestet. Von den 98 Hefen konnten vier nicht eindeutig bestimmt werden und sieben wurden fehlinterpretiert. Alle untersuchten *C. dubliniensis*-, *C. glabrata*-, *C. guilliermondii*-, *C. krusei*-, *C. parapsilosis*- und *C. tropicalis*-Stämme wiesen typische Spektren, wie in Abbildung 6.3 zu sehen, auf. Vier der 32 *C. albicans*-Stämme konnten nicht eindeutig bestimmt werden und wurden als ‚*C. albicans/C. dubliniensis*‘ identifiziert. Alle sieben *C. africana*-Stämme wurden fälschlicherweise als *C. albicans* erkannt. Nach Aussage des durchführenden Labors, des Ripac-Labor in Potsdam-Golm, erlaubt die MALDI-TOF MS keine Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. africana*. Abbildung 6.2 zeigt die sich stark ähnelnden Massenspektren der beiden Subspezies.



**Abbildung 6.2** MALDI-TOF MS-Spektren von *C. africana* (oben) und *C. albicans* (unten)



**Abbildung 6.3** MALDI-TOF MS-Spektren von *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (von oben nach unten) (Fortsetzung auf Seite 72)



**Abbildung 6.3** MALDI-TOF MS-Spektren von *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (von oben nach unten) (Fortsetzung von Seite 71)

Die Ergebnisse der sechs Stämme, die nicht in die Untersuchungsreihe eingeschlossen wurden, stimmen mit den Ergebnissen der Sequenzierung überein. Drei *C. albicans*-

Stämme zeigten untypische Reis-Agarbefunde und ein weiterer wies in der API ID 32 C- und Reis-Agaruntersuchung die Eigenschaften von *C. dubliniensis* auf. In zwei Fällen lagen laut Befund der chromogenen Medien Mischkulturen vor, die in der MALDI-TOF MS und Sequenzierung nicht erkannt wurden. Die Ergebnisse der sechs Stämme werden nicht als Fehler gewertet, da sie mit den Befunden der Sequenzierung übereinstimmen und diese in diesem Zusammenhang als richtig positive Referenz gewertet werden. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der MALDI-TOF MS in Tabelle 6.1 dargestellt.

Die Sensitivität der MALDI-TOF MS unter Einbeziehung der sieben nicht erkannten *C. africana*-Stämme sowie der vier nicht eindeutig erkannten Stämme lag bei 0,89. Wurden die vier *C. albicans*-Stämme, die als ‚*C. albicans/C. dubliniensis*‘ identifiziert wurden, nicht als Fehler gewertet, stieg die Sensitivität auf 0,93. Ähnliche Werte ermittelten Rosenvinge et al. (2013) (0,94, Axima/SARAMIS-System bzw. 0,92, Bruker/BioTyper-System) und Seyfarth et al. (2012) (0,94, Axima/SARAMIS-System). In der Literatur werden sowohl hohe als auch geringere Erfolgsraten angegeben. Diese Tatsache scheint in der Auswahl der in die Studie aufgenommenen Spezies begründet zu sein. Untersuchungen, die weniger verbreitete Spezies einschließen, zeigen deutlich niedrigere Ergebnisse. Seltene Spezies sind in den Datenbanken zur Auswertung der MALDI-TOF MS mit weniger Spektren vertreten oder können vollständig fehlen (Lohmann et al. 2013). Beispielhaft dafür sind die Untersuchungen von Lohmann et al. (2013), die Sensitivitäten von 0,87 (Bruker/BioTyper-System) und 0,83 (Axima/SARAMIS-System) ergaben und nur zu 59 % häufig vorkommende Spezies einschlossen. Dabei ist auffallend, dass alle getesteten *C. albicans*-, *C. dubliniensis*-, *C. glabrata*-, *C. guilliermondii*-, *C. krusei*-, *C. parapsilosis*- und *C. tropicalis*- Stämme, die zu den verbreiteteren Spezies zählen, von beiden Systemen vollständig erkannt wurden. Eine Studie von Bader et al. (2011), die zu 93 % häufig vorkommende Spezies einschloss (Lohmann et al. 2013), ergab höhere Werte von 0,98 (Bruker/BioTyper-System) und 0,96 (Axima/SARAMIS-System). Lima-Neto et al. (2014) ermittelten sogar eine Sensitivität von 1 (Axima/SARAMIS-System). Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 97,96 % der häufig vorkommenden *Candida*-Spezies korrekt getestet. 2,04 % konnten nicht vollständig identifiziert, jedoch auf zwei sich ähnelnde Spezies richtig eingegrenzt werden. Die Gesamtsensitivität war aufgrund der sieben *C. africana*-Stämme, für die keine Spektren in der Datenbank hinterlegt sind, deutlich geringer (0,89). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2.

#### 6.1.4 Molekularbiologische Methoden

Die PCR und Sequenzierung der ITS-Sequenzen dienten der eindeutigen Bestimmung der *Candida*-Spezies. Dafür wurden 98 der 101 in die Studie eingeschlossenen *Candida*-Stämme sowie die sechs nicht verwendeten Stämme molekularbiologisch untersucht. Von den 98 Hefen wurden alle *C. albicans*-, *C. dubliniensis*-, *C. glabrata*-, *C. guilliermondii*-, *C. krusei*-, *C. parapsilosis*- und *C. tropicalis*-Stämme richtig erkannt. Die sieben *C. africana*-Stämme wurden als *C. albicans* interpretiert. Die sechs Kulturen, die nicht in die Studie aufgenommen wurden, ergaben die gleichen Ergebnisse wie bei der MALDI-TOF MS (siehe Kapitel 6.1.3).

Die Sensitivität der PCR und Sequenzierung lag bei 0,93, da die sieben *C. africana*-Stämme nicht erkannt wurden. Eine Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. africana* mit Hilfe der ITS-Sequenzierung ist laut durchführender Laboratorien, dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Berlin und der Firma SMB, nicht möglich. Diese Aussage wird von diversen Studien bestätigt (Sharma et al. 2014, Romeo und Criseo 2008). Ciardo et al. (2006) beschreiben eine interspezifische Sequenzhomologie der ITS-Region zwischen *C. albicans* und *C. africana* von 99,3 – 99,8 %, die annähernd identisch mit der intraspezifischen Homologie von *C. albicans* (99,3 – 100,0 %) ist. In der Literatur werden jedoch Methoden beschrieben, die eine Unterscheidung von *C. albicans* und *C. africana* erlauben. Durch PCR-basierte Vervielfältigung einer hochpolymorphen Region im HWP1-Gen können *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. africana* aufgrund von Längenunterschieden der Amplifizierungsprodukte differenziert werden (Romeo und Criseo 2008, Shan et al. 2014, Sharma et al. 2014). Auch die Pyrosequenzierung (35 Basenpaare) der ITS2-Region erlaubt eine Unterscheidung aufgrund variabler Nukleotide in diesem Bereich (Bormann et al. 2010, 2013). Alle anderen Spezies konnten eindeutig identifiziert werden, weshalb dieses Verfahren für alle Stämme außer *C. africana* als Referenzmethode gewählt wurde. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2.

#### 6.1.5 Zusammenfassung: Identifizierung der Pilzstämme

Zusammenfassend sind in Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 die Ergebnisse der diagnostischen Tests Reis-Agar, ID 32C-System, MALDI-TOF MS und Sequenzierung zur Identifizierung der Candidastämme vergleichend dargestellt. Als richtig positive Referenz wurden dabei für alle getesteten Spezies außer *C. africana* die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung gewählt.



Spezies (Anzahl)	Sequenzierung	MALDI-TOF MS	API ID 32C	Reis-Agar
<i>C. africana</i> (7)	7/7 <i>C. albicans</i>	7/7 <i>C. albicans</i>	7/7 <i>C. sake</i>	7/7 <i>C. africana</i>
<i>C. albicans</i> (32)	32/32 <i>C. albicans</i>	28/32 <i>C. albicans</i> 4/32 <i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i>	31/32 <i>C. albicans</i> 1/32 <i>C. albicans</i> / <i>C. sake</i>	9/9 <i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i> (22)	21/21 <i>C. dublin.</i>	20/21 <i>C. dublin.</i>	20/22 <i>C. dublin.</i> 2/22 <i>C. dublinien./</i> <i>C. albicans</i>	4/4 <i>C. dublin.</i>
<i>C. glabrata</i> (6)	6/6 <i>C. glabrata</i>	6/6 <i>C. glabrata</i>	6/6 <i>C. glabrata</i>	1/1 <i>C. glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i> (7)	5/5 <i>C. guillerm.</i>	6/6 <i>C. guillerm.</i>	7/7 <i>C. guillerm.</i>	0/0 <i>C. guillerm.</i>
<i>C. krusei</i> (5)	5/5 <i>C. krusei</i>	5/5 <i>C. krusei</i>	5/5 <i>C. krusei</i>	1/1 <i>C. krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i> (17)	17/17 <i>C. paraps.</i>	17/17 <i>C. paraps.</i>	17/17 <i>C. paraps.</i>	0/0 <i>C. paraps.</i>
<i>C. tropicalis</i> (5)	5/5 <i>C. tropicalis</i>	4/4 <i>C. tropicalis</i>	5/5 <i>C. tropicalis</i>	0/0 <i>C. tropicalis</i>
ausgeschlossene Stämme (6):				
1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	uneindeutig <sup>2</sup>
2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	uneindeutig <sup>2</sup>
3 <sup>1</sup>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	uneindeutig <sup>3</sup>
6 <sup>1</sup>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-

**Tabelle 6.1** Identifizierung der *Candida spp.* mit Hilfe von Sequenzierung, MALDI-TOF MS, API ID 32C und Reis-Agar (Anmerkung: <sup>1</sup> auf chromogenen Medien als Mischkultur identifiziert, <sup>2</sup> Fehlen von Chlamydosporen, <sup>3</sup> ähnliches Wuchsbild wie *C. tropicalis*/*C. parapsilosis*)

Spezies	Sequenzierung	MALDI-TOF MS	API ID 32C	Reis-Agar
<i>C. africana</i>	Sens.: 0	Sens.: 0	Sens.: 0	Sens.: 1
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1
<i>C. albicans</i>	Sens.: 1	Sens.: 0,88	Sens.: 0,92	Sens.: 0,79
	Spez.: 0,9	Spez.: 0,9	Spez.: 0,97	Spez.: 1
<i>C. dubliniensis</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 0,91	Sens.: 1
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 0,99	Spez.: 0,96
<i>C. glabrata</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 0,99	Spez.: 0,96
<i>C. guilliermondii</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: -
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: -
<i>C. krusei</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1
<i>C. parapsilosis</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: -
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: -
<i>C. tropicalis</i>	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: 1	Sens.: -
	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: 1	Spez.: -
Gesamt	Sens.: 0,93	Sens.: 0,89	Sens.: 0,89	Sens.: 0,89

**Tabelle 6.2** Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Tests Sequenzierung, MALDI-TOF MS, API ID 32C und Reis-Agar für die untersuchten *Candida spp.*

## 6.2 Chromogene Medien

### 6.2.1 BBL CHROMagar Candida und MAST ID - CHROMagar Candida

BBL CHROMagar Candida (CAC-B) und MAST ID – CHROMagar Candida (CAC-M) basieren auf dem gleichen chromogenen Gemisch (CHROMagar Candida) und werden deshalb gemeinsam diskutiert. Laut Herstellerangaben und zahlreichen Studien erlauben CAC-B und CAC-M die eindeutige Identifizierung von *C. albicans*, *C. krusei* und *C. tropicalis* (Bernal et al. 1996, Horvath et al. 2003, Houang et al. 1997, Medhavan et al. 2011, Odds und Bernaerts 1994, Paritpokee et al. 2005, Pfaller et al. 1996, Willinger und Manafi 1999). Diese Untersuchungen zeigen, dass auf beiden chromogenen Nährmedien eine Differenzierung von *C. tropicalis* anhand der Farbe und von *C. krusei* mittels Farbe und Morphologie möglich ist, jedoch keine eindeutige Identifizierung von *C. albicans*.

Die zweifelsfreie Bestimmung von *C. albicans* gelang aufgrund ähnlicher Farbausprägungen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* nicht. Auf beiden Medien bildeten diese Subspezies unterschiedliche Farbabstufungen von hell- bis dunkelgrün und hell- bis dunkeltürkis aus, wobei alle als ‚türkis‘ bezeichneten Kolonien einen unterliegenden

Grüntön mit türkisblauem Schimmer aufwiesen, ähnlich dem von Odds und Davidson (2000) beschriebenen für *C. dubliniensis* typischen bläulichen Grün. Der unterliegende Grünton blasse nach 72-stündiger Inkubation ab oder verschwand in einigen Fällen vollständig. In allen oben genannten Studien wurde *C. dubliniensis* nicht in die Untersuchungen einbezogen. Zahlreiche andere Studien gehen explizit auf die Differenzierbarkeit von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ein. Dabei ergeben sich gegensätzliche Untersuchungsergebnisse. Jabra-Rizk et al. (1999) ermittelten für beide CAC-Medien Sensitivitäten von jeweils 1 für die Farbe Hell- bis Mittelgrün bei *C. albicans* und die Farbe Dunkelgrün bei *C. dubliniensis*. Auch andere Studien zeigen ähnliche Ergebnisse (Giammanco et al. 2002, Kirkpatrick et al. 1998, Medhavan et al. 2012, Odds und Davidson 2000, Sullivan et al. 1997). Im Kontrast dazu stehen unter anderem die Untersuchungen von Borman et al. (2013), Daef et al. (2012), Eraso et al. (2006), Mähne et al. (1994), Odds und Bernaerts (1998), Pasligh et al. (2008), Tinteln et al. 1999, Us und Cengiz (2006) sowie Yazdanpanah et al. (2014), die bei beiden Subspezies das Vorkommen sowohl hell-, mittel- als auch dunkelgrüner Farbausprägungen dokumentierten und somit auf eine fehlende Differenzierbarkeit von *C. albicans* und *C. dubliniensis* schlossen. Einige Autoren beschreiben, dass die Fähigkeit zur Ausbildung der typischen Farben Hell- bzw. Mittelgrün und Dunkelgrün bei manchen Kulturen nach Lagerung oder wiederholter Subkultivierung verloren geht (Eraso et al. 2006, Hospenthal et al. 2006, Odds und Davidson 2000). Odds und Davidson (2000) weisen darauf hin, dass die dunkelgrün-bläuliche Färbung von *C. dubliniensis* auch bei frischen Kulturen per se nicht als Basis einer vollständig sicheren Identifizierung genutzt werden kann. Um eine eindeutige Differenzierbarkeit zu gewährleisten, kann CAC mit Pal's Agar substituiert werden, sodass nicht nur farbliche, sondern auch morphologische Unterschiede sichtbar gemacht werden (Daef et al. 2012, Sahand et al. 2005). *C. africana* bildete auf beiden Nährmedien ausschließlich türkise Kolonien aus und fiel durch sein langsames Wachstum (Tietz et al. 2001) sowie morphologisch durch eine elliptische Wuchsform z.T. mit zipfelförmigen Ausläufern mehrerer Einzelkolonien auf. Durch das verzögerte Wachstum prägte sich die türkise Färbung erst nach 72 Stunden bei allen Stämmen vollständig aus. Eine Abgrenzung gegenüber *C. albicans* und *C. dubliniensis* war farblich nur bedingt möglich, da auf CAC-B *C. albicans* und auf CAC-M *C. albicans* und *C. dubliniensis* ebenfalls türkise Färbungen ausprägten. Die in dieser Studie beobachtete elliptische Wuchsform stellt jedoch ein einzigartiges Merkmal dar und ermöglichte dadurch die eindeutige Identifizierung. Da nur sieben *C. africana*-Stämme getestet wurden, sollte diese Eigenschaft auf chromogenen Medien weiter evaluiert werden. Die Subspezies

*C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* wiesen auf beiden CAC-Medien ein Farbspektrum von Weiß bis Rosa auf und konnten deswegen allein anhand der Farbe nicht differenziert werden. Ausnahmen bilden *C. glabrata* auf CAC-M und *C. guilliermondii* auf CAC-B. *C. glabrata* zeigte aufgrund der Ausprägung lilafarbener Schattierungen eine Sensitivität und Spezifität von 0,5/0,83 und 0,99/1 auf CAC-M nach 48/72 Stunden. *C. guilliermondii* bildete auf CAC-B ebenfalls lilafarbene Schattierungen aus und erreichte dadurch eine Sensitivität und Spezifität von 0,71/0,86 und 1/0,99 (48/72 Stunden). Die farblichen Unterschiede waren vor allem im direkten Vergleich mit den andern getesteten Subspezies zu erkennen. Deshalb sollte die Lilafärbung von *C. glabrata* und *C. guilliermondii* nicht als alleiniges Kriterium zur Identifizierung genutzt werden. Einige Autoren bestätigen, dass *C. glabrata* ein dunkleres Rosa bzw. Lila ausbildet und deshalb gut differenzierbar ist (Horvath et al. 2003, Hospenthal et al. 2006). Studien, die ein größeres Spektrum an Subspezies einschließen, unterstützen diese Aussage jedoch nicht (Freydiere 1996, Odds & Bernaerts 1994, Odds & Davidson 2000). Eine Differenzierung von *C. krusei* gegenüber anderen Subspezies gelang mit einer Sensitivität und Spezifität von 1 auf beiden CAC-Medien. Dies war jedoch nur aufgrund der typischen blassen, flachen, flaumigen, großflächigen Morphologie möglich (Odds und Bernaerts 1994, Willinger und Manafi 1999), die alle getesteten Stämme aufwiesen. Eine alleinige Entscheidung anhand der Farbe war nicht möglich, da *C. glabrata*, *C. guilliermondii* und *C. parapsilosis* ebenfalls rosafarbene, jedoch glatte und kleinere Kolonien ausprägten. Diese Ergebnisse werden von zahlreichen Studien bestätigt (Baixench et al. 2006, Pfaller et al. 1996, Sivakumar et al. 2008). Die Identifizierung von *C. tropicalis* gelang mittels der typischen blaugrauen Farbe auf CAC-B mit einer Sensitivität und Spezifität von je 1. Auf CAC-M traten nach 48 und 72 Stunden zusätzlich einige lila- und türkise Kolonien auf, sodass bei hoher Spezifität von 1 nur eine geringe Sensitivität von 0,2/0,6 (48/72 Stunden) vorlag. Ähnliche Werte für die beiden Nährmedien ermittelten Willinger und Manafi (1999). Beighton et al. (1995) beobachteten auf CAC-M ebenfalls eine variable Färbung der Kolonien von Lila bis Dunkelblau. Bei gleichzeitigem Vorhandensein eines charakteristischen, braun-lilafarbenen, die Kolonie umgebenden Ringes (Hospenthal et al. 2002, Odds & Bernaerts 1994) sei aber eine Identifizierung möglich. Dieser Ring konnte in diesen Untersuchungen auf dem CAC-B mit einer Sensitivität von 0,8/1 (48/72 Stunden) und auf dem CAC-M mit 0,8/0,6 (48/72 Stunden) festgestellt werden. Diverse Studien bestätigen die gute Differenzierbarkeit von *C. tropicalis* (Daef et al. 2012, Medhavan et al. 2012, Murray et al. 2005, Odds und Davidson 2000, Pfaller et al. 1996), einige Autoren berichten aber von geringeren Sensitivitäten von 0,6 bis 0,8 (Jain et al. 2012, Ozcan et al.

2010). Sivakumar et al. beschreiben sogar das Auftreten hellgrüner Kolonien wie bei *C. albicans*.

### 6.2.2 chromID Candida

ChromID Candida erlaubt laut Herstellerangaben und diversen Studien (Eraso et al. 2006a, Eraso et al. 2006b, Fricker-Hidalgo et al. 2000, Guzel et al. 2011, Letscher-Bru et al. 2001, Willinger et al. 2001) die Identifizierung von *C. albicans* anhand der Blaufärbung der Kolonien. Weiterhin gibt bioMérieux an, dass eine vorläufige Identifizierung von *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* und *C. kefyr* durch Ausbildung rosafarbener Schattierung möglich ist und diese Subspezies nachfolgend weiter biochemische und/oder immunologisch getestet werden sollten.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine Differenzierung von *C. albicans* aufgrund der farblichen Ähnlichkeit zu *C. dubliniensis* und *C. africana* nicht möglich ist. Mit einer Sensitivität von 0,59 bzw. 0,53 nach 48 bzw. 72 Stunden zeigten die getesteten *C. albicans*-Stämme mittel- bis dunkelblaue und mit einer Sensitivität von 0,41 bzw. 0,43 mittel- bis dunkeltürkise Kolonien, die farblich nur im direkten Vergleich voneinander unterscheidbar waren. *C. dubliniensis* bildete ausschließlich türkise Schattierungen aus. Diese Ergebnisse werden von den Untersuchungen von Fricker-Hidalgo et al. (2000) bestätigt, stehen jedoch im Kontrast zu andern Studien, die eine gute Differenzierbarkeit der beiden Subspezies feststellen (Eraso et al. 2006a, Willinger et al. 2001). Eraso et al. (2006b) fanden bei allen untersuchten *C. dubliniensis*-Stämmen türkise Färbungen, wohingegen *C. albicans* mit einer Sensitivität von 0,91 kobaltblaue und mit einer Sensitivität von 0,09 türkisblaue Kolonien ausbildete. Willinger et al. (2001) beschreiben eine blau-grüne Färbung von *C. dubliniensis* im Gegensatz zur Blaufärbung von *C. albicans*. Die in dieser Arbeit untersuchten *C. africana*-Stämme zeigten ebenfalls türkisfarbene Kolonie. Die Färbung war jedoch aufgrund des langsamen Wachstums dieser Subspezies (Tietz et al. 2001) heller ausgeprägt und erst nach 72 Stunden zu finden. Alonso-Vargas et al. (2008) machten ähnliche Entdeckungen. Die extrem verzögerte Farbentwicklung auf chromID unterschied *C. africana* von anderen Subspezies. *C. tropicalis* prägte, wie vom Hersteller angegeben, nach 48 Stunden rosafarbene Schattierungen aus. Da *C. guilliermondii* mit einer Sensitivität von 0,86 ebenfalls diese Farbe zeigten, war eine Differenzierung dieser Subspezies nicht möglich. Diverse Studien geben zudem an, dass einige *C. tropicalis*-Stämme weiße (Eraso et al. 2006b, Letscher-Bru et al. 2001, Willinger et al. 2001) und/oder andere Färbungen ausbilden (Fricker-

Hidalgo et al. 2000, Guzel et al. 2011). *C. guilliermondii* zeigte mit einer Sensitivität von 0,14, genau wie *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis*, weiße Kolonien. Ähnliche Angaben finden sich in der Literatur (Eraso et al. 2006b, Fricker-Hidalgo et al. 2000, Guzel et al. 2011, Letscher-Bru et al. 2001, Willinger et al. 2001). Für *C. glabrata*, *C. guilliermondii* und *C. parapsilosis* werden unterschiedliche Häufigkeiten für die Farben Rosa und Weiß angegeben (Eraso et al. 2006b, Fricker-Hidalgo et al. 2000, Guzel et al. 2011, Letscher-Bru et al. 2001, Willinger et al. 2001). Zur eindeutigen Unterscheidung dieser Subspezies und von *C. tropicalis* sind weitere Testungen mit z.B. biochemischen Methoden notwendig. Auch *C. krusei* bildete eine weiße Färbung aus. Mit Hilfe der typischen rauen Morphologie (Eraso et al. 2006b, Guzel et al. 2011, Letscher-Bru et al. 2001) war eine Differenzierung trotz farblicher Gemeinsamkeiten zu anderen Subspezies jedoch möglich. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigten vier der fünf Stämme die charakteristische, raue Wuchsform. Ein Stamm bildete kleinere, glatte Kolonien mit einem regelmäßigen Rand. Anhand dieses Kriteriums gelang die Identifikation von *C. krusei* mit einer Sensitivität von je 0,8 und einer Spezifität von je 1 nach 48/72 Stunden.

#### 6.2.3 CandiSelect 4

Laut Herstellerangaben ist mit Hilfe von CandiSelect 4 eine eindeutige Differenzierung von *C. albicans* sowie eine mutmaßliche Differenzierung der Spezies *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* möglich. *C. albicans* soll rosa- bis lilafarbene Färbungen ausprägen.

Diese Aussage wird von diesen Untersuchungen sowie anderen Studien bestätigt (Adams et al. 2010, Fothergill und Rinaldi 2008, Nawrot et al. 2005, Sendid et al. 2007), die Sensitivitäten von 0,98 bis 1 für *C. albicans* ermittelten. Liguori et al. (2010) konnten hingegen nur eine Sensitivität von 0,86 feststellen. Ursächlich dafür könnte das vom Hersteller erwähnte und von Sendid et al. (2007) bei Primärkulturen beobachtete seltene Auftreten von *C. albicans*-Stämmen sein, die eine weiße Färbung ausbilden. Die in dieser Studie getesteten Stämme prägten ausschließlich rosa- oder lilafarbene Schattierungen aus. Laut der Firma BioRad zeigt *C. dubliniensis* nach 48 Stunden ebenfalls rosa- oder lilafarbene Färbung, was mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen übereinstimmt. Nach 72 Stunden war jedoch zu beobachten, dass mit einer Sensitivität von 0,95 ein Teil der Kolonien einen Farbwechsel zu Türkis vollzog. Aufgrund dieses Merkmals, das von Nawrot et al. (2005) bereits nach 48 Stunden Inkubation beobachtet werden konnte, ist eine Differenzierung von *C. albicans* eindeutig möglich. Auch *C. africana* zeigte nach 48

Stunden vorwiegend lilafarbene Schattierungen. Sechs von sieben Stämmen (Sensitivität 0,86) bildeten aber nach 72 Stunden eine charakteristische Türkisblaufärbung aus, die ausgehend von der Kolonie in den Agar diffundierte, und unterschieden sich dadurch deutlich von *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Zusätzlich bildete *C. africana* mit einer Sensitivität von 0,71/1 nach 48/72 Stunden Kolonien mit zipfelförmigen Ausläufern, die sonst keine der anderen Subspezies zeigten. *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* prägen laut Hersteller unterschiedliche Türkistöne sowie verschiedene Wachstumsmuster aus. Das wird von den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Eine eindeutige Differenzierung mit einer Sensitivität von 1 und einer Spezifität von 0,99 nach 48 und 72 Stunden war jedoch nur für *C. krusei* aufgrund der typischen rauen Morphologie möglich (Adams et al. 2010, Sendid et al. 2007). Alleinig basierend auf der Farbgebung konnten die Subspezies *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* nicht sicher unterschieden werden, da *C. glabrata* und *C. parapsilosis* ausschließlich und *C. guilliermondii* nach 48 Stunden mit einer Sensitivität von 0,57 hellgrüne/helltürkise Kolonien ausbildeten. *C. krusei* und *C. tropicalis* wuchsen nach 48 Stunden, genau wie 43 % der *C. guilliermondii*- Stämme, in dunkel-/ mitteltürkisen Schattierungen. Auch andere Studien beschreiben mögliche Schwierigkeiten in der eindeutigen Identifizierung dieser Subspezies. Dabei konnten für *C. glabrata* nur Sensitivitäten von 0,75-0,85 festgestellt werden (Nawrot et al. 2005, Sendid et al. 2002). Im Kontrast dazu stehen die Untersuchungen von Adams et al. (2010), die für *C. glabrata* eine Sensitivität von 1 und eine Spezifität von 0,9 ermittelten, obwohl die Testungen *C. parapsilosis* und *C. guilliermondii* einschlossen. Ähnlich abweichende Ergebnisse gibt es für *C. tropicalis*, die Sensitivitäten von 0,6 bis 1 umfassen (Adams et al. 2010, Nawrot et al. 2005, Sendid et al. 2002).

#### 6.2.4 Candida-Ident-Agar

Der Candida-Ident-Agar dient der direkten Identifizierung von *C. albicans*. Laut Hersteller zeigt *C. albicans* grüne bis blaugüne Färbungen und alle andern Subspezies weiße bis beige Schattierungen. Dieses chromogene Medium wurde bis jetzt in keiner weiteren Studie evaluiert.

Diese Untersuchungen bestätigen, dass *C. albicans* eine grüne bis blaugüne Färbung ausbildet. Nach 48 Stunden lagen grüne Kolonien vor, die sich im Verlauf vollständig dunkeltürkis einfärbten. Darin unterschied sich *C. albicans* von *C. dubliniensis*, der nach 48 Stunden mit einer Sensitivität von 0,91 ein helleres Türkis bildete, das nach 72 Stunden

zu Mitteltürkis nachdunkelte. Eine Differenzierung der beiden Subspezies war nach 48 Stunden mit einer Sensitivität und Spezifität von 1 und 0,9 (*C. albicans*) bzw. 0,91 und 1 (*C. dubliniensis*) definitiv möglich. Nach 72 Stunden gelang diese jedoch aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen Mittel- und Dunkeltürkis nicht. Eine Unterscheidung der beiden Subspezies von *C. africana* war mit einer Sensitivität und Spezifität von 1 und 0,96 erst nach 72 Stunden möglich. Aufgrund des typischen langsamen Wachstums dieser Spezies (Tietz et al. 2001) fanden sich nach 48 Stunden mit einer Sensitivität von 0,57 nur sehr kleine Kolonien mit spärlicher, grüner Farbentwicklung. Erst nach 72 Stunden hatten alle Stämme eine grüne Färbung und Koloniegröße, ähnlich der von *C. albicans* nach 24 Stunden, entwickelt, sodass eine Differenzierung von den türkisen *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämmen möglich war. Auch *C. tropicalis* prägte nach 72 Stunden mit einer Sensitivität von 0,8 grüne Färbungen aus. Dieses Grün zeigte jedoch einen unterliegenden Beigeton, war heller als bei *C. africana* und wurde von einem weißen Rand umrahmt, sodass die beiden Subspezies unterschieden werden konnten. Vom Hersteller wird explizit darauf hingewiesen, dass *C. tropicalis* für gewöhnlich Beigetöne ausbildet, einige Stämme jedoch grün erscheinen können. Zusätzlich fanden sich nach 48 Stunden bei einem der sieben *C. africana*-Stämme und nach 72 Stunden bei allen ausgehend von der Kolonie zipfelförmige Ausläufer, die eine eindeutige Unterscheidung gegenüber allen getesteten Subspezies ermöglichten. Nach 48 Stunden wies *C. tropicalis*, genau wie *C. guilliermondii* und *C. krusei*, verschiedene Schattierungen von Beige auf, sodass keine Differenzierung erfolgen konnte. Auffällig war, dass *C. krusei* nicht die typischen rauen, großen Kolonien mit unscharf begrenztem Rand, sondern großflächige, glatte, glänzende, scharf umrandete Kolonien ausbildete. Auch die Identifizierung von *C. glabrata* und *C. parapsilosis* gelang nicht, da beide Subspezies weiße Färbungen ausprägten.

### 6.2.5 Brilliance Candida

Brilliance Candida erlaubt laut Hersteller die Differenzierung von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. krusei*. *C. albicans* bildet dabei grüne Kolonien. Zahlreiche Studien bestätigen die gute Identifizierbarkeit von *C. albicans* anhand der Grünfärbung und beschreiben Sensitivitäten von 0,91 bis 1 nach 48 Stunden (Adams et al. 2010, Baalham et al. 2005, Baixench et al. 2006, Ghelardie et al. 2008, Ozcan et al. 2010). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen für *C. albicans* ein breites Spektrum an Grüntönen, von Türkisgrün bis Olivgrün sowie z.T. zweifarbig Türkisgrün/Olivgrün. Da *C. dubliniensis* ebenfalls diese Färbung aufwies, lagen lediglich eine Sensitivität und Spezifität von 1 und 0,67 für *C. albicans* und 1 und 0,59 für *C. dubliniensis* vor. Bei



genauerer Differenzierung der Grüntöne zeigte sich aber ein Unterschied in der Farbausprägung nach 72 Stunden. *C. albicans* bildete mit einer Sensitivität von 0,97 zweifarbig türkisgrün/olivgrüne Kolonien, wohingegen alle *C. dubliniensis*-Stämme (Sensitivität 1) türkisgrüne bis blaue Kolonien ausprägten, was auf eine eindeutige Differenzierbarkeit der beiden Stämme hinweist. Ähnliche Beobachtungen machten Ghelardi et al. (2008) bereits nach 24 und 48 Stunden. Sie empfehlen jedoch, die türkisblaue Färbung von *C. dubliniensis* als Indikator, nicht aber als alleiniges Differenzierungskriterium zu nutzen. *C. krusei* prägte in allen Fällen die typische trockene, raue Morphologie aus (Ghelardie et al. 2010). Farblich bildete diese Subspezies braune Schattierungen, ähnlich derer von *C. glabrata*, *C. guilliermondii* und *C. parapsilosis*, die jedoch zusätzlich einen rosafarbenen Unterton und einen rosafarbenen Ring um das braune Zentrum aufwiesen. Aufgrund der Morphologie konnte eine Sensitivität von 1 nach 48 und 72 Stunden erreicht werden. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben mit Sensitivitäten von 0,97 bis 1 (Baixench et al. 2010, Ghelardie et al. 2008, Baalham et al. 2005), aber auch von 0,56 (Adams et al. 2010). Eine Differenzierung allein anhand der Farbe kann zu falschen Ergebnissen führen. Ozcan et al. (2010) konnten die charakteristische Rosafärbung bei keinem Stamm beobachten, sondern beschreiben weiß, beige und kastanienbraun gefärbte Kolonien. *C. glabrata*, *C. guilliermondii* und *C. parapsilosis* wiesen ein Spektrum an Brauntönen, von Beige bis Kastanienbraun auf, das keine Unterscheidung der Subspezies ermöglichte und von anderen Autoren ebenso beschrieben wird (Adams et al. 2010, Baixench et al. 2006, Ozcan et al. 2010). *C. tropicalis* zeigte im Rahmen dieser Untersuchungen, anders als von der Firma Oxoid angegeben, nach 48 und 72 Stunden vor allem dunkellilafarbene Schattierungen. Die charakteristische Blaufärbung (Baixench et al. 2006, Ghelardie et al. 2008, Baalham et al. 2005) konnte nur bei einem von fünf Stämmen (Sensitivität 0,2) beobachtet werden. Auch Adams et al. (2010) ermittelten eine geringe Sensitivität von 0,4 für diese Subspezies. Ozcan et al. (2010) fanden bei keinem der Stämme die typische Färbung, sondern beschreiben Braun- und Beigetöne.

#### **6.2.6 Zusammenfassung: Chromogene Medien**

In Betrachtung der Ergebnisse der chromogenen Nährmedien fällt auf, dass *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* meist ähnliche Färbungen ausprägten und dadurch keine Differenzierung möglich war. Lediglich *C. krusei* ließ sich durch seine typische raue Morphologie auf CAC-M, CAC-B, chromID Candida, CandiSelect 4 und Brilliance Candida mit Sensitivitäten und Spezifitäten von 0,8 bis 1 bereits nach 48

Stunden unterscheiden. Auf dem Candida-Ident-Agar zeigte er hingegen glatt umrandete, ebene Kolonien und konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Auch die Spezies *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* wiesen farblich große Ähnlichkeiten auf, sodass eine eindeutige Identifizierung häufig schwierig war. Durch bestimmte Charakteristika, die z.T. erst nach 72 Stunden Inkubationszeit auftraten, konnten diese Spezies auf einigen Nährmedien jedoch voneinander unterschieden werden. *C. africana* zeigte auf CAC-M, CAC-B, CandiSelect 4 und Candida-Ident-Agar bereits nach 48 Stunden als einzige Spezies eine elliptische Wuchsform mit z.T. zipfelförmigen Ausläufern. Auf CandiSelect 4 war nach 72 Stunden außerdem eine Differenzierung von *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis* anhand der Farbe möglich, da *C. africana* dunkeltürkisblaue Schattierungen ausbildete und sich mehrere Kolonien der *C. dubliniensis*-Stämme türkis färbten. Auch auf dem Candida-Ident-Agar war eine farbliche Unterscheidung der drei Spezies möglich. *C. albicans* und *C. dubliniensis* zeigten nach 48 Stunden grüne bzw. türkise Schattierungen, die eine Identifizierung ermöglichten. Nach 72 Stunden waren beide türkis gefärbt, der langsamer wachsende *C. africana* jedoch grün, sodass sich dieser differenzieren ließ. Brilliance Candida ermöglichte nach 72 Stunden eine eindeutige Bestimmung von *C. albicans*, der zweifarbig türkisgrün/olivgrüne Kolonien bildete, und von *C. dubliniensis*, der ein türkisgrün bis blaues Wachstum aufwies. *C. tropicalis* nahm eine Sonderstellung ein, da er auf den unterschiedlichen Nährmedien entweder Färbungen zeigte, die *C. africana*/*C. albicans*/*C. dubliniensis* oder *C. glabrata*/*C. guilliermondii*/*C. krusei*/*C. parapsilosis* ähnelten. Eine Identifizierung war nur auf CAC-B und CAC-M möglich, auf denen er nach 48 Stunden neben der charakteristischen Blaugraufärbung einen braun-lilafarbenen, die Kolonie umgebenden Ring bildete.

Insgesamt zeigte sich auf den chromogenen Medien bei allen *Candida*-Stämmen ein Farbumschlag, mit Ausnahme von *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* auf chromID Candida sowie *C. glabrata* und *C. parapsilosis* auf Candida-Ident-Agar, und ermöglichte somit eine mutmaßliche Identifizierung. Tabelle 6.3 zeigt zusammenfassend die, in dieser Studie ermittelten, Fähigkeiten der verschiedenen chromogenen Nährmedien zur Unterscheidung der *Candida*-Spezies.

<u>Spezies</u>	<u>CAC-M</u>	<u>CAC-B</u>	<u>chromID</u> <u>Candida</u>	<u>CandiSelect</u> <u>4</u>	<u>Candida-</u> <u>Ident</u>	<u>Brilliance</u> <u>Candida</u>
C. africana	sicher	sicher	mutmaßlich	sicher	sicher	nein
C. albicans	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	sicher	sicher	sicher
C. dubliniensis	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	sicher	sicher	sicher
C. glabrata	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	nein	mutmaßlich
C. guilliermondii	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich
C. krusei	sicher	sicher	sicher	sicher	mutmaßlich	sicher
C. parapsilosis	mutmaßlich	mutmaßlich	nein	mutmaßlich	nein	mutmaßlich
C. tropicalis	sicher	sicher	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich	mutmaßlich

**Tabelle 6.3** Fähigkeit der chromogenen Nährmedien zur Differenzierung von *Candida*-Spezies

Im Vergleich der Ergebnisse der chromogenen Nährmedien mit denen der anderen diagnostischen Testverfahren fällt auf, dass mithilfe von PCR und Sequenzierung, MALDI-TOF MS, API ID 32C sowie Reis-Agar deutlich mehr *Candida*-Spezies sicher identifiziert werden können. Im Unterschied zu diesen Verfahren erlauben chromogene Medien jedoch die Kultivierung von Hefen sowie die Detektion von Mischkulturen (Adams et al. 2010, Baixench et al. 2006). API ID 32C sowie Reis-Agar sind Methoden, die der genauen Bestimmung der Subspezies dienen, und werden erst nach Vorliegen eines positiven Kulturbefundes durchgeführt (Seebacher et al. 2006). Chromogene Medien hingegen können bereits zur Anzucht der Hefen genutzt werden. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Nährmedien, wie Sabouraud-Glucose-Agar, besteht darin, dass diese durch Einfärbung der Kolonien eine Aussage darüber geben können, ob eine Infektion mit *Candida* vorliegt. Zusätzlich ist gegebenenfalls schon eine Differenzierung möglich, sodass weiterführende Labortestungen nicht mehr nötig sind (Mendling und Seebacher 2003, Reinel et al. 2008). Diverse Studien zeigen, dass die Verwendung chromogener Nährmedien in der Routinediagnostik von *Candida*-Infektionen zeitsparend und kostengünstig ist (Adams et al. 2010, Ainscough und Kibbler 1998, Guzel et al. 2011, Koehler et al. 1999). PCR und Sequenzierung sowie die MALDI-TOF MS sind schnelle und exakte, aber auch sehr teure Verfahren zur Identifizierung von Hefen, die noch nicht oder nur in großen Labors in der Routinediagnostik eingesetzt werden (Chao et al. 2014, Lima-Neto et al. 2014, Ruhnke et al. 2011, Willinger 2007). Sie benötigen nicht zwingend eine Vorkultur des zu testenden Erregers, sondern können direkt mit Proben aus z.B. Blutkulturen arbeiten.

Diese Untersuchungen zeigen, dass alle getesteten, chromogenen Nährmedien sehr gut zur Anzucht von *Candida*-Spezies geeignet sind. Auf CAC-B, CAC-M, chromID Candida und CandiSelect 4 gelang die Isolierung aller untersuchten Hefestämme. Auf dem Candida-Ident-Agar fand sich bei vier der *C. parapsilosis*-Stämme und auf dem Brilliance Candida-Agar bei sechs der *C. africana*-Stämme kein Wachstum. Damit ergeben sich Isolationsraten von 100 % für CAC-B, CAC-M, chromID Candida und CandiSelect 4, von 96,04 % für Candida-Ident und von 94,06 % für Brilliance Candida. In der Literatur finden sich verschieden Angaben zu Isolationsraten, die von 90,4 % bis 100 % variieren (Baumgartner 1996, Eraso et al. 2006 *J Clin Microbiol*, Ghelardi et al. 2007, Guzel et al. 2011, Letscher-Bru et al. 2002, Ozcan et al. 2010).

## 7 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die getesteten chromogenen Nährmedien sehr gut zur Anzucht von *Candida*-Spezies genutzt werden können und eine Vorkultur nicht mehr nötig ist. Besonders geeignet sind BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida, chromID Candida und CandiSelect 4, die ein Wachstum aller untersuchten *Candida*-Stämme erlauben. Lediglich der Candida-Ident-Agar zeigt eingeschränkte Isolationseigenschaften für *C. parapsilosis* und der Brilliance Candida-Agar für *C. africana*. Trotzdem können auch diese Nährmedien gut als alleiniges Kultivierungsmedium eingesetzt werden.

Diese Studien belegen, dass alle getesteten chromogene Nährmedien eine Identifizierung als *Candida*-Spezies durch Färbung der Kolonien aufgrund einer Enzymaktivität der Hexosaminidase oder Phosphatase erlauben. Ausnahmen bilden chromID Candida und Candida-Ident-Agar, auf denen bei *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* bzw. *C. glabrata* und *C. parapsilosis* kein Farbumschlag zu beobachten ist. Eine eindeutige Differenzierung gelingt für einige Subspezies, entspricht aber nicht immer den Herstellerangaben. Die sichere Erkennung der am häufigsten vorkommenden Spezies *C. albicans* ist nur mithilfe von CandiSelect 4, CandidaIdent und Brilliance Candida möglich. BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida und chromID Candida erlauben dies nicht, da *C. albicans* und *C. dubliniensis* ähnliche Farben ausprägen. *C. africana* kann auf BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida, CandiSelect 4 und Candida-Ident-Agar durch Ausbildung einer ovalen Kolonieförmigkeit mit zipfelförmigen Ausläufern sowie farblich auf CandiSelect 4 durch eine kräftige dunkeltürkisblaue Färbung mit Diffusion der Farbe in den umliegenden Nährboden sicher erkannt werden. Auch der Candida-Ident-Agar ermöglicht aufgrund der verzögerten Farbentwicklung eine farbliche Differenzierung von *C. africana* gegenüber *C. albicans*. *C. krusei* kann auf allen chromogenen Nährmedien mit Ausnahme von Candida-Ident-Agar mittels seiner typischen rauen Morphologie eindeutig bestimmt werden. Eine sichere Identifizierung von *C. tropicalis* erlauben ausschließlich BBL CHROMagar Candida und MAST ID - CHROMagar Candida. Alle *Candida*-Spezies, die nicht genau bestimmt werden können, sollten anschließend mithilfe weiterführender Methoden wie Reisagarkultivierung oder API ID 32C-Testung differenziert werden. Im Vergleich der chromogenen Nährmedien erweist sich CandiSelect 4 als aussagekräftigster Test. Er ermöglicht die eindeutige Erkennung von *C. africana*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. krusei* sowie die mutmaßliche Identifizierung von *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* und

*C. tropicalis*. Den geringsten Informationsgewinn bietet chromID Candida, der ausschließlich *C. krusei* sicher erkennt, keinen Farbumschlag bei *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* zeigt und die weiteren getesteten Spezies nur mutmaßlich identifiziert. BBL CHROMagar Candida, MAST ID - CHROMagar Candida, Candida-Ident-Agar und Brilliance Candida bieten verschiedene Vor- und Nachteile, ähneln sich aber bezüglich der Gesamtdifferenzierungsrate.

In Betrachtung aller für diese Untersuchungen genutzten Tests zeigt sich die höchste Sensitivität für die ITS-Sequenzierung. Auch die MALDI-TOF MS ist speziell zur Erkennung häufig vorkommender Spezies hervorragend geeignet. Diese Methoden erlauben jedoch keine Identifizierung von *C. africana*. Sie ermöglichen eine schnelle, jedoch kostenaufwändige Erkennung von *Candida*-Spezies, bei der keine Vorkultur nötig ist, und sollten deshalb vor allem in der Diagnostik systemischer *Candida*-Infektionen, die eines raschen Therapiebeginns bedürfen, zur Anwendung kommen. Die konventionellen Methoden der Reisagarkultivierung und API ID 32C-Testung weisen ebenfalls hohe Sensitivitäten auf und erlauben zudem eine Erkennung von *C. africana*. Anzumerken ist, dass mit dem API ID 32C-System *C. africana* nur bei visuellem Ablesen identifiziert werden kann. Diese Untersuchungen sind kostengünstiger, aber zeitaufwändiger als Sequenzierung und MALDI-TOF MS, da sie eine Vorkultivierung des Erregers voraussetzen. Ein Einsatz in der Diagnostik von lokalen Candidosen ist sinnvoll. Chromogene Nährmedien sollten in diesem diagnostischen Pfad den ersten Schritt einnehmen. Sie eignen sich sehr gut zur Anzucht sowie Identifizierung von *Candida*-Spezies und erlauben einen orientierenden Überblick. Gegebenenfalls ist bereits eine sichere Identifizierung des Erregers anhand der Färbung möglich. Die weiterführende Bestimmung mit Hilfe der Reisagarkultivierung und API ID 32C-Testung ist sinnvoll. Zudem ermöglichen chromogene Medien die Detektion von Mischkulturen, was ITS-Sequenzierung, MALDI-TOF MS, Reisagarkultivierung und API ID 32C-Testung nicht können. Dadurch verkürzt sich die Zeitspanne bis zur Diagnosestellung und Laborkosten können gespart werden.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. 1997. The Epidemiology of Hematogenous Candidiasis Caused by Different Candida Species. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 1122-1128.
2. Adams HJ, Richardson SE, Roscoe M, Boroumandi S, Gris M, Yau YCW. 2010. An Implementation Strategy for the Use of Chromogenic Media in the Rapid, Presumptive Identification of Candida Species. *The Open Mycology Journal*, 4: 33-38.
3. Ainscough S, Kibbler CC. 1998. An ecaluation oft the cost- effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiological laboratory. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 623-628.
4. Al-Fattani MA, Douglas LJ. 2004. Penetration of Candida Biofilms by Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (9): 3291-3297.
5. Al-Hedaithy SSA, Fotedar R. 2002. Recovery and studies on chlamydospore-negative Candida albicans isolated from clinical specimen. *Medical Mycology*, 40: 301-306.
6. Al-Rawahi GN, Roscoe DL. 2013. Ten-year review of candidemia in a Canadian tertiary care centre: Predominance of non-albicans Candida species. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 24 (3): 65-68.
7. Alem MAS, Douglas LJ. 2005. Prostaglandine production during growth of Candida albicans biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 1001-1005.
8. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA. 2013. Increasing Echinocardin Resistance in Candida glabrata : Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 56 (12): 1724-1732.

9. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A, the Barcelona Candidemia Project Study Group. 2006. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections : Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 20002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (5): 1681-1685.
10. Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano JF, Guarro J, Pontón J, Quindós G. 2008. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Medical Mycology*, 46: 167-170.
11. Alothman AF, Al-Musawi T, Al-Abdely HM, Al Salman J, Almaslamani M, Yared N, Butt AA, Raghubir N, El Moris W, Al Thaqafi AO. 2014. Clinical practice guidelines for the management of invasive *Candida* infections in adults in the Middle East Region : Expert panel recommendations. *Journal of Infection and Public Health*, 7: 6-19.
12. Anaissie EJ, Darouiche RO, Abi-Said D, Uzun O, Mera J, Gentry LO, Williams T, Kontoyiannis DP, Karl CL, Bodey GP. 1996. Management of Invasive Candidal Infections : Results of a Prospective Randomized, Multicentre Study of Fluconazole Versus Amphotericin B and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, 23: 964-972.
13. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schønelyder HC, Tvede M. 2005. Semination Surveillance of Fungemia in Denmark : Notably High Rates of Fungemia and Numbers of Isolates with Reduced Azole Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (9): 4434-4440.
14. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. 2002. In vivo Pathogenicity of Eight Medically Relevant *Candida* Species in an Animal Model. *Infection*, 30 : 286-291.
15. Arendrup MC, Perlin DS. 2014. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem?. *Current Opinion – Infectious Diseases*, 27 (6): 484-492.
16. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. 2014. Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (3) : 490-526.



17. Baalham T, de Caux B, Alexander C, Brown L, Dunsmuir R, Shankland GS, Blackman M. 2005. Evaluation of chromogenic Candida agar. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (Supplement 2): 206.
18. Bader O, Weig M, Taverne- Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhns M. 2011. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1359-1365.
19. Bär W, Hecker H. 2002. Diagnosis of systemic Candida infections in patients of the intensive care unit. Significance of serum antigens and antibodies. *Mycoses*, 45: 22-28.
20. Baixench MT, Taillandier A, Paugam A. 2006. Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA®, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses*, 49 : 311-315.
21. Baptista M, Nona J, Ferreira M, Sampaio I, Abrantes M, Tomé T, Neto T, Barroso R, Serelha M, Virella D. 2014. Invasive fungal infection in neonatal intensive care units : a multicenter survey. *Journal of Chemotherapy*, 2014 November 3rd : e1973947814Y0000000222.
22. Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa N. 1995. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (11) : 3025.
23. Bernal S, Mazuelos EM, García M, Aller AI, Martínez MA, Gutiérrez MJ. 1996. Evaluation of CHROMagar Candida Medium For Isolation and Presumptive Identification of Species of *Candida* of Clinical Importance. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 24 : 201-204.
24. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP, The NEMIS Study Group. 2001. Risk factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients : The NEMIS Prospective Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 177-186.

25. Borg-van Zeplin M, Monod M. 2003. Fungale Pathogene. Pharmazie in unserer Zeit, 2: 110-116.
26. Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Johnson EM. 2010. Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2. Journal of Clinical Microbiology, 48 : 3648-3653.
27. Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. 2013. Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. Journal of Clinical Microbiology, 51 (3) : 967-972.
28. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. 2013. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *C. albicans* 1. Journal of Immunology, 190 (8): 4136-4148.
29. Calandra T, Bille J, Schneider R, Mosimann F, Francioli P. 1989. Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. The Lancet, 334 (8677): 1437-1440.
30. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. 1995. Oral *Candida* : Clearance, Colonization, or Candidiasis?. Journal of Dental Research, 74 (5): 1152-1161.
31. Chen SC, Sorrell TC, Chang CC, Paige EK, Bryant PA, Slavin MA. 2014. Consensus guidelines for the treatment of yeast infections in the haematology, oncology and invasive care setting, 2014. Internal Medicine Journal, 44: 1315-1332.
32. Cho QT, Lee TF, Peng LY, Chen PH, Teng LJ, Hsueh PR. 2014. Comparison of the Accuracy of Two Conventional Phenotypic Methods and Two MALDI-TOF MS Systems with That of DNA Sequencing Analysis for Correctly Identifying Clinically Encountered Yeasts. PLOS ONE, 9 (10) : e109376.
33. Christ AE Jr, Dietz TJ, Kampschroer K. 1996. Comparison of the Murex *C. albicans*, Albicans-Sure, and BactiCard Candid test kits with the Germ Tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology, 34 : 2616-2618.

34. Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP. 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (1): 77-84.
35. Cockayne A, Odds FC. 1984. Interactions of *Candida albicans* Yeast Cells, Germ Tubes and Hyphae with Human Polymorphonuclear Leucocytes in vitro. *Journal of General Microbiology*, 130: 465-471.
36. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. 1997. Candidiasis : the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*, 11: 557-567.
37. Crissey JT. 1995. *Manual of Medical Mycology*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Science, 94.
38. Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. 2014. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1): 255-262.
39. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2000. *Atlas of clinical fungi*. Zweite Aufl. Utrecht, Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 184-222.
40. Des Champs-Bro B, Leroy.Cotteau A, Pasquier F, Francois N, Corm S, Lemaitre L, Poulain D, Yakoub-Agha I, Alfandari S, Sendid B. 2011. Invasive fungal infections: epidemiology and analysis of antifungal prescriptions in onco-haematology. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 36: 152-160.
41. Dörfelt H, Jetschke G. 2001. *Wörterbuch der Mycologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 19-20, 65.
42. Durán-Valle MT, Danz-Rodríguez N, Muños-Paraíso C, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. 2014. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32C. *Medical Mycology*, 52: 342-349.
43. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, Quindós G. 2006a. Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (9): 3340-3345.

44. Eraso E, Sahand IH, Villar-Vidal M, Marcos C, Moragues MD, Madariaga L, Pontón J, Quindós G. 2006b. Usefulness of Candida ID2 agar for presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Medical Mycology*, 44: 611-615.
45. Erb-Downward JR, Noverr MC. 2007. Characterization of Prostaglandin E2 Production by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 75 (7): 3498-3505.
46. Farah CS, Elahi S, Drysdale K, Pang G, Gotjamanos T, Seymour GJ, Clancy RL, Ashman RB. 2002. Primary Role for CD4+ T Lymphocytes in Recovery from Oropharyngeal Candidiasis. *Infection and Immunity*, 70 (2): 724-731.
47. Fenselau C, Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 20 (4): 157-171.
48. Fothergill A, Rinaldi M. 2008. Comparison of Bio-Rad *CandiSelect* 4 for Isolation and Identification of Fungi in Clinical Specimens [Poster] as presented at the 48<sup>th</sup> Annual ICAAC/IDSA 46<sup>th</sup> Annual Meeting.
49. Freydiere AM. 1996. Evaluation of CHROMagar *Candida* plates. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (8): 2048.
50. Fricker-Hidalgo H, Orenga S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Grillot R. 2001. Evaluation of *Candida* ID, a New Chromogenic Medium for Fungal Isolation and Preliminary Identification of Some Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (4): 1647-1649.
51. Gantt SL, Valentine NB, Saenz A J, Kingsley MT, Wahl KL. 1999. Use of an internal control for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of bacteria. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10 (11): 1131-1137.
52. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT. 2006. Time of Initiation of Fluconazole Therapy Impacts Mortality in Patients with Candidemia: A Multi-Institutional Study. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 25-31.
53. Ghelardi E, Pichierri G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. 2008. Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 141-147.

54. Giamarellou H, Antoniadou A. 1996. Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17 (8): 558-564.
55. Giammanco GM, Pizzo G, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici M. 2002. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol Immunol*, 17: 89-94.
56. Glöckner A. 2010. Leitliniengerechte Therapie: Candidämie/invasive Candidiasis. *Mycoses*, 53 (Supplement 1): 30-35. R, Horré R, Karthaus M, Kujath P, Willinger B, Presterl E, Rath P, Rickerts V, Ritter J, Lass-Flörl C, Ruhnke M. 2011. Diagnose und Therapie von *Candida*-Infektionen – Gemeinsame Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMYKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG). *Chemotherapie Journal*, 3: 67-93.
57. Groll AH, Buchheidt D, Cornely O, Glöckner A, Heinz W, Höhl R, Horré R, Karthaus M, Kujath P, Willinger B, Presterl E, Rath P, Rickerts V, Ritter J, Lass-Flörl C, Ruhnke M. 2011. Diagnose und Therapie von *Candida*-Infektionen, Gemeinsame Empfehlungen der Deutschen Mykologischen Gesellschaft (DMYKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG). *Chemotherapie Journal*, 3: 67-93.
58. Guarro J, Gené J, Stehigel AM. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (3): 454-500.
59. Gudlaugson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. 2003. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 37 (9): 1172-1177.
60. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Medical Mycology*, 49: 16-25.
61. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. 2001. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Vierte Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 870-874.

62. Harris DM, Hata DJ. 2013. Rapid identification of bacteria and candida using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12: 2.
63. Herdegen T. 2013. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Dritte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 581.
64. Hipler UCh, Rahmig N. *Hefemykosen – Diagnostik und Therapie [Praktikumsskript]*. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
65. Hof H, Dörries R. 2009. *Medizinische Mikrobiologie*. Vierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 458-477.
66. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. 2006. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5: 1.
67. Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. 2002. Persistence of Pigment Production by Yeast Isolates Grown on CHROMagar *Candida* Medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (12): 4768-4770.
68. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. 2003. Direct Isolation of *Candida* spp. From Blood Cultures oft he Chromogenic Medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol*, 41 (6): 2629-2632.
69. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. 1997. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in diagnostic laboratory. *J Clin Pathol*, 50: 563-565.
70. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AAMA, Merz WG, Falkler, Jr. WA, Meiller TF. 2001. Evaluation of a Reformulates CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (5): 2015-2016.
71. Jain N, Mathur P, Misra MC, Behera B, Xess I, Sharma SP. Rapid identification of yeast isolates from clinical specimens in critically ill trauma ICU patients. *Journal of Laboratory Physicians*, 4 (1): 30-34.

72. Jayatilake JAMS, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. 2006. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35: 484-491.
73. Kantarcioğlu AS, Yücel A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses*, 45: 160-165.
74. Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, Sanche SE, Cantu RA, Rinaldi MG, Patterson TF. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar *Candida* Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *J Clin Microbiol*, 36 (10): 3007-3012.
75. Koehler AP, Chu KC, Houang ETS, Cheng AFB. 1999. Simple, Reliable, and Cost-Effective Yeast Identification Scheme for Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (2): 442-426.
76. Kothe F. 2007. Pilze – Einteilung der Pilze. In: Fuchs G. 2007. *Allgemeine Mikrobiologie*. Achte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 61-65.
77. Kozłowska EA, Nuber D. 1996. *Leitfaden der praktischen Mykologie: Einführung in die mykologische Diagnostik*. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts- Verlag, 24-25.
78. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, Rijdt TD, Maertens J, van Wijngaerden E. 2007. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 541-547.
79. Lakner A. 2008. *Identifizierung von Candida Spezies mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung* [Dissertation]. Ulm: Universität Ulm.
80. Lehmann WD. 1996. *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 3, 14-16, 133-137.

81. Letscher-Bru V, Meyer MH, Galois AC, Waller J, Candolfy E. Prospective Evaluation of New Chromogenic Medium Candida ID in Comparison with Candiselect, for Isolation of Molds and Isolation and Presumptive Identification of Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4): 1508-1510.
82. Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. *Barzilian Journal of Microbiology*, 45: 515-522.
83. Liguori G, Di Onofrio V, Gallé F, Lucariello A, Albano L, Catania MR, Guida M. 2010. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 51: 121-124.
84. Lohmann C, Sabou M, Moussaoui W, Prévost G, Delarbre JM, Candolfi E, Gravet A, Letscher-Bru V. 2013. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (4): 1231-1236.
85. Lopez CM, Wallich R, Riesbeck K, Skerka C, Zipfel PF. 2014. *Candida albicans* Uses the Surface Protein Gpm1 to Attach to Human Endothelial Cells and to Keratinocytes via the Adhesive Protein Vitronectin. *PLoS ONE*, 9 (3): e90796.
86. Maertens J, Vreboos M, Boogaerts M. 2001. Assessing risk factors for systemic fungal infections. *European Journal of Cancer Care*, 10: 56-62.
87. Mähneß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. 2005. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, 48 (1): 55-61.
88. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348: 1546-1554.
89. Medhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. 2011. Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar *Candida* as a primary identification method for various *Candida* species. *Tropical Biomedicine*, 28 (2): 269-274.



90. Mendling W. 2015. Guideline: Vulvovaginal Candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses*, 58 (Supplement 1): 1-15.
91. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. 2007. Pathogenicity and Drug Resistance in *Candida albicans* and Other Yeast Species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungaria*, 54 (3): 201-235.
92. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, Harrison LH, Seaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch SM. 2005. Excess Mortality, Hospital Stay, and Cost Due to Candidemia: A Case-Control Study Using Data From Population - Based Candidemia Surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26 (6): 540-547.
93. Murray CK, Beckius ML, Green JA, Hospenthal DR. 2005. Use of chromogenic medium in the isolation of yeasts from clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 981-985.
94. Naglik JR, Alrecht A, Bader O, Hube B. 2004. *Candida albicans* proteinase and host/Pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6 (10): 915-926.
95. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. 2008. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, 154 (Pt 11): 3266-3280.
96. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw J, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, Agabian N, Challacombe SJ. 2003. Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Human Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 188: 469-479.
97. Nawrot U, Włodarczyk K, Skala J, Przondo-Mordarska APM, Nolard N. 2005. Evaluation of CandiSelect 4 a chromogenic medium for yeast differentiation. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (Supplement 2): 715-716.

98. Nenoff P. 2010. Hefepilzinfektionen. In: Plttenberg A, Meigel W, Schöfer H. 2010. Infektionskrankheiten der Haut – Grundlagen, Diagnostik und Therapiekonzepte für Dermatologen, Internisten und Pädiater. Dritte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG, 169-178.
99. Nenoff P, Handrick W, Seyfarth HJ. 2005. Diagnostik lebensbedrohlicher Pilzinfektionen. In: Tietz HJ, Nenoff P, Ullmann AJ. 2005. Organmykosen auf einen Blick: Diagnostik und Therapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 13-28.
100. Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Zietz HJ. 2014. Mykologie – ein Update Teil 2: Dermatomykosen: Klinisches Bild und Diagnostik. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 12 (9): 749- 779.
101. Niimi K, Shepherd MG, Cannon RD. 2001. Distnguishing Candida Species by  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase Activity. Journal of Clinical Microbiology, 39 (6): 2089-2097.
102. Nnadi NE, Ayanbimpe GM, Scordino F, Okolo MO, Enweani IB, Criseo G, Romeo O. 2012. Isolation and molecular characterization of Candida africana from Jos, Nigeria. Medical Mycology, 50: 765-767.
103. Odds FC. 1987. Candida Infection: An Overview. Critical Reviews in Microbiology, 15 (1): 1-5.
104. Odds FC, Bernaerts R. 1994. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. Journal of Clinical Microbiology, 32 (8): 1923.
105. Odds FC, Davidson A. 2000. “Room temperature“ use of CHROMagar Candida. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 38: 147-150.
106. Oeser C, Vergnano S, Naidoo R, Anthony M, Chang J, Chow P, Clarke P, Embleton N, Kennea N, Pattnayak S, Reichert B, Scorrer T, Tiron I, Watts T, Sharland M, Heath PT, the National Infection Surveillance Network (neoIN). 2014. Neonatal invasive fungal infection in England 2004-2010. Clinical Microbiology and Infection, 20 (9): 936-941.

107. Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. 2006. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, 34 (3): 857-863.
108. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. 2003a. Amphotericin B: Time for a New “Gold Standard“. *Clinical Infectious Disease*, 37: 415-425.
109. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kaufmann CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. 2003b. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream Candida Isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (10): 3149-3154.
110. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. 2001. Performance of Chromogenic Candida Agar and CHROMagar Candida in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Medical Mycology*, 48: 29-34.
111. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr. DK, Calandra TF, Edwards Jr. JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel J. 2009. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48: 503-535.
112. Paritpokee S, Hall G, Procop G. 2005. Rapid Identification of Yeast Isolates using BD BBL CHROMagar Candida [Paper]. Presented at the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology.
113. Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M. 2010. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43 (2): 147-154.
114. Patolia S, Kennedy E, Zahir M, Patolia S, Gulati N, Narendra D, Vadde R, Pokharel S, Schmidt FM, Enriquez D, Quist J. 2013. Risk factors for candida blood stream infection in medical ICU and role of colonization – A retrospective study. *British Journal of Medical Practitioners*, 6 (2): 618-623.
115. Perlin DS. 2014. Echinocandine Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management. *Drugs*, 74: 1573-1585.

116. Persat F, Topenot R, Piens MA, Thibaut A, Dannaoui E, Picot S. 2002. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses*, 45: 455-460.
117. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and Outcome of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One*, 9 (7): e101510.
118. Pfaller MA, Castsanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. 2012. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazol-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (4): 1199-1203.
119. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. 1996. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (1): 58.
120. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelievich J, Barnes R, Wadula J, the Global Antifungal Surveillance Group. 2008. Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (3): 842-849.
121. Pinho Resende JC, de Resende MA, Saliba JL. 2002. Prevalence of *Candida* spp. In hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses*, 45: 306-312.
122. Quindós G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31 (1): 42-48.
123. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012: 528521.
124. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2008. *Biochemie. Zweite Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 492.

125. Reinelt D, Plettenberg A, Seebacher C, Abeck D, Brasch J, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmeyer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, Korting A, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Titz HJ. 2008. Orale Candidose – Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7: 593-597.
126. Rieth H. 1967. D-H-S-Diagnostik. *Fortschritte der Medizin*, 85: 594-595.
127. Rieth H. 1995. *Mykologische Diagnostik [Sondereinband]*. Git Verlag, 26- 27.
128. Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 11: 275-288.
129. Romeo O, Criseo G. 2008. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using HWP1 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62: 230-233.
130. Rosenthal SA, Furnari D. 1959. Chlamydospore Production by *Candida albicans* – Comparison of Dehydrated Rice Extract Agar with Other Media. *The Journal of Investigative Dermatology*, 32: 115-116.
131. Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig A, Arendrup MC, Jensen TG, Gahrn- Hansen B, Kemp M. 2013. Performance of matrix-assisted laser desorption-time off light mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses*, 56: 229-235.
132. Röchel R, Dellmann A, Schaffrinski M, Donhuijsen K. 2004. Vereinfachte Pilzdetektion – Screeningmethode mit optischem Aufheller. *Pathologe*, 25: 235-237.
133. Röchel R, Schaffrinski M. 1999. Versatile Fluorescent Staining of Fungi in Clinical Specimens by Using the Optical Brightener Blankophor. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (8): 2694-2696.
134. Ruhnke M. 2006. Epidemiology of *Candida albicans* infections and the role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Current Drug Targets*, 7: 503-535.

135. Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, Buchheidt D, Glöckner A, Heinz W, Höhl R, Horré R, Karthaus M, Kujath P, Willinger B, Presterl E, Rath P, Ritter J, Glasmacher A, Lass-Förl C, Groll AH. 2011. Diagnosis and therapy of Candida infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich\_Society for Chemotherapy. *Mycoses*, 54: 279-310.
136. Rupec J, Korting HC. 2003. Hefen. In: Plettenberg A, Meigel W. 2003. *Dermatologische Infektiologie*. Berlin: Blackwell Verlag, 221-232.
137. Sahand ICH, Moragues M, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. 2005. Supplementation of CHROMagar Candida Medium with Pal's Medium for Rapid Identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11): 5768-5770.
138. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin T, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W, The National Epidemiology of Mycosis Study Group. 2000. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19 (4): 319-324.
139. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. 2007. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimen. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(3): 906-914.
140. Schaller M. 2005. *Candida albicans* – Interaktion mit der Schleimhaut und dem Immunsystem. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 4: 328-338.
141. Seebacher C. 2001. *Dermatomykosen: Grundlagen und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 135-138.
142. Seebacher C, Abeck D, Brasch J, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ. 2006. Candidose der Haut – Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 4 (7): 591-596.

143. Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ. 2007. Onychomycosis – Guidelines of the German Society of Dermatology and German-speaking Mycological Society. *Mycoses*, 50: 321-327.
144. Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R. 1990. *Mykosen: Epidemiologie – Diagnostik – Therapie*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 21-46.
145. Seebacher C, Korting HC, Abeck D, Brasch J, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Ham G, Hipler UC, Hof H, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ. 2010. Tinea of glabrous skin. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8 (7): 549-554.
146. Seeliger HPR, Heymer T. 1981. *Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt - Lehrbuch und Atlas*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG, 54-66.
147. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. 2003. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(12): 5660-5664.
148. Sendid B, François N, Standaert A, Dehecq E, Zerimech F, Camus D, Poulain D. 2007. Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 495-499.
149. Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hipler UC. 2012. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses*, 55(3): 276-280.
150. Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. 2014. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 52: 636-640.
151. Sharma C, Muralidhar S, Xu J, Meis JF, Chowdhary A. 2014. Multilocus sequence typing of *Candida africana* from patients with vulvovaginal candidiasis in New Delhi, India. *Mycoses*, 57(9): 544-552.

152. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Federation of European Microbiological Society (FEMS) Microbiological Reviews*, 36: 288-305.
153. Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K, Menon T. 2008. Use of CHROMagar in the Differentiation of Common Species of *Candida*. *Mycopathologia*, 167: 47-49.
154. Smith H. Opportunistic Infection. *British Medical Journal*, 2: 107-110.
155. Smith RF, Blasi D, Dayton SL. 1973. Phosphatase Activity Among *Candida* Species and Other Yeasts Isolated from Clinical Material. *Applied Microbiology*, 26 (3): 364-367.
156. Soll DR. 2003. Mating-type locus homozygosis, phenotypic switch and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *BioEssays*, 26: 10-20.
157. Stone NRH, Gorton LR, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. 2013. Evaluation of PNA-FISH Yeast Traffic Light for Rapid Identification of Yeast Directly from Positive Bloodcultures and Assessment of Clinical Impact. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (4): 1301-1302.
158. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Roderio L, Lloyd S, Henman M, Coleman D. 1997. Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (4): 960-964.
159. Taschdjian CL, Kozinn PJ, Toni EF. 1970. Opportunistic yeast infections, with special references to candidiasis. *Annals of the New York Academy of Science*, 174 (2): 606-622.
160. Thieman WJ, Palladino MA. 2007. *Biotechnologie*. München: Pearson Education Deutschland GmbH, 100-103.
161. Tietz HJ. 2011. *Antimykotika von A-Z. Fünfte Auflage*. Stuttgart: Ligatur Verlag für Klinik und Praxis.
162. Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. 2001. *Candida africana* spec. nov., a new human pathogen or a variant of *C. albicans*?. *Mycoses*, 44: 437-455.



163. Tietz HJ, Ulbricht H. 1999. Humanpathogene Pilze der Haut und Schleimhäute - Entnahme, Anzucht, Differenzierung. Hannover: Schlütersche-Verlag, 146-152.
164. Tinteln K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. 2000. Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4): 1599-1608.
165. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R, the ECMM Working Group on Candidaemia. 2004. Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23: 317-322.
166. Traidl-Hoffmann C, Eyerich K, Maier E, Behrendt H, Ring J, Hofmann H. 2010. Mukokutane Candida-Infektionen. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 135 (27): 1379-1388.
167. Urban CF, Reicherd U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8 (4): 668-676.
168. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLOS Pathogens*, 5 (10): e1000639.
169. Us E, Cengiz SA. 2006. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in an university hospital in Ankara. *Mycoses*, 50: 13-20.
170. Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Hundeiker M, Bonifaz A. 2013. Opportunistische Hefe-Mykosen: Candidose, Kryptokokkose, Trichosporonose und Geotrichose. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11 (5): 381-395.
171. Verweij PM, Breuker IM, Rijs AJMM, Meis JFGM. 1999. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 271-273.

172. Verweij PE, Meis JF. 2000. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*, 2: 80-87.
173. Warwood NM, Blazevic DJ. 1977. Comparison of Cream Rice Agar and Horse Serum for Differentiating Germ Tubes of *Candida albicans* from Filaments of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 5 (4): 501-502.
174. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. 2001. Performance of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of Candida Species in Comparison to CHROMagar Candida. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10): 3793-3795.
175. Willinger B, Manafi M. 1999. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. *Mycoses*, 42: 61-65.
176. Willinger B. 2007. Trends und neue Entwicklungen in der Diagnostik von Pilzinfektionen. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(19-20): 476-481.
177. Wingard JR. 1995. Importance of Candida Species Other than *C. albicans* as Pathogens in Oncology Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 20: 115-125.
178. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 309-317.
179. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2006. Inflammatory response and clinical course of adult patients with nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* spp.. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (2): 170-177.
180. Witheway M, Oberholzer U. 2004. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 350-357.
181. Xiao M, Fan X, Chen SCA, Wang H, Sun ZY, Liao K, Chen SL, Yan Y, Kang M, Hu ZD, Chu YZ, Hu TS, Ni YX, Zou GL, Kong F, Xu YC. 2014. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *Journal of Antimicrobial Therapy*, dku460.

182. Yazdanpanah A, Khaithir TMN. 2014. Issues in Identifying Germ Tube Positive Yeasts by Conventional Methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 28: 1-9.
183. Zilberberg MD, Kollef MH, Arnold H, Labelle A, Micek ST, Kothari S, Shorr AF. 2010. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 10: 150.

## 9 Anhang

Substrat	C. albicans		C. dubli- niensis	C. africana			C. sake
	1	2		Tietz et al. 2001	Ergebnis 1	Ergebnis 2	
D-Galaktose	+	+	+	+	+	+	+
Cycloheximid (Actidion)	+	+	+	+	+	+	-
D-Saccharose	+	-	+	+	+	+	+
N-Acetyl-Glukosamin	+	+/-	+	-	-	-	+
Milchsäure	+	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+/-	-	-	-	-	+
Kalium 2- Ketoglukonat	+	+	+	+	+	+	+
Methyl- $\alpha$ D- Glukopyranosid	+	-	-	+/-	+/-	-	-
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Inosit	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbit	+	+/-	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+/-	-	+	+	+	+
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Palatinose	+	+/-	-	+	+	+	+
Erythrit	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Natrium Glukuronat	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	+/-
Kalium Glukonat	-	-	-	-	-	-	+/-
Levulinsäure	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukose	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	+/-
Glukosamin	+	+/-	+/-	-	-	-	+/-

**Tabelle 9.1** Assimilationsmuster verschiedener *Candida spp.* (Herstellerangaben bioMérieux für *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. sake*, Tietz et al. 2001) im Vergleich mit den Testergebnissen (Ergebnis 1: RV 01/05, Ergebnis 2: MYA 2669, 5 Stämme aus Patientenproben)

	<u><i>C. africana</i></u>		<u><i>C. albicans</i></u>		<u><i>C. dubliniensis</i></u>		<u><i>C. tropicalis</i></u>	
	<i>48h</i>	<i>72h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<u>Mast ID-CHROMagar</u>								
Grün	0	0	0,75	0,19	0,86	0,45	0	0
Türkis	0,86	1,0	0,25	0,81	0,14	0,55	0,4	0,4
Blau/Blaugrau	0	0	0	0	0	0	0,4	0,6
Rosa/Braun	0	0	0	0	0	0	0	0
Lila	0	0	0	0	0	0	0,2	0
Weiß	0,14	0	0	0	0	0	0	0
<u>BBL CHROMagar</u>								
Grün	0	0	0,97	0,75	1,0	1,0	0	0
Türkis	0,57	1,0	0,03	0,25	0	0	0	0
Blau-türkis	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0
Lila	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosa/Braun	0	0	0	0	0	0	0	0
Weiß	0,43	0	0	0	0	0	0	0
<u>chromID Candida</u>								
Türkis/Blau	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0	0
Rosa	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0
Weiß	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>CandiSelect 4</u>								
Hellettürkis/Hellgrün	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittel-/Dunkeltürkis	0	0	0	0	0	0	1,0	1,0
Türkisblau	0,14	0,86	0	0	0	0,05	0	0
Lila	0,86	0,14	0,59	1,0	0,68	0	0	0
Rosa	0	0	0,41	0	0,32	0	0	0
Lila + Türkis	0	0	0	0	0	0,95	0	0
Weiß	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Candida-Ident-Agar</u>								
Grün	0,57	1,0	1,0	0	0,9	0	0,2	0,8
Türkis	0	0	0	1,0	0,91	1,0	0	0,2
Beige	0	0	0	0	0	0	0,8	0
Weiß	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Brilliance Candida</u>								
Grün	0	0	0	0,03	0,05	0	0	0
Türkis/Blau	0,14	0,14	0,69	0	0,95	1,0	0,2	0,2
Grün + Türkis	0	0	0,31	0,97	0	0	0	0
Lila	0	0	0	0	0	0	0,8	0,8
Braun	0	0	0	0	0	0	0	0
Weiß	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 9.2** Sensitivität der verschiedenen Koloniefärbungen auf den untersuchten chromogenen Nährmedien nach 48 und 72 Stunden für die getesteten *Candida spp.* (¹ Sensitivität unter Einbeziehung der typischen rauen Morphologie) (Fortsetzung auf Seite 112)

	<u><i>C. glabrata</i></u>		<u><i>C. guilliermondii</i></u>		<u><i>C. krusei</i></u>		<u><i>C. parapsilosis</i></u>	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
<u>Mast ID-CHROMagar</u>								
Grün	0	0	0	0	0	0	0	0
Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Blau/Blaugrau	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosa/Braun	0,5	0,17	0,71	1,0	1,0 <sup>1</sup>	1,0 <sup>1</sup>	0,06	0,59
Lila	0,5	0,83	0	0	0	0	0	0
Weiß	0	0	0,29	0	0	0	0,94	0,41
<u>BBL CHROMagar</u>								
Grün	0	0	0	0	0	0	0	0
Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Blau/Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Lila	0	0,17	0,71	0,86	0	0	0	0
Rosa/Braun	1,0	0,84	0,14	0,14	1,0 <sup>1</sup>	1,0 <sup>1</sup>	0	0,82
Weiß	0	0	0,14	0	0	0	1,0	0,18
<u>chromID Candida</u>								
Türkis/Blau	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosa	0	0	0,71	0,86	0	0	0	0
Weiß	1,0	1,0	0,29	0,14	1,0/0,8 <sup>1</sup>	1,0/0,8 <sup>1</sup>	1,0	1,0
<u>CandiSelect 4</u>								
Helltürkis/Hellgrün	0,67	1,0	0,57	0	0	0	0,94	1,0
Mittel-/Dunkeltürkis	0	0	0,43	1,00	1,0 <sup>1</sup>	1,0 <sup>1</sup>	0	0
Türkisblau	0	0	0	0	0	0	0	0
Lila	0	0	0	0	0	0	0	0
Rosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Lila + Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Weiß	0,33		0		0	0	6	0
<u>Candida-Ident-Agar</u>								
Grün	0	0	0	0	0	0	0	0
Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Beige	0	0	0,29	0,86	1,0	1,0	0	0
Weiß	1,0	1,0	0,71	0,14	0	0	0,76	0,76
<u>Brilliance Candida</u>								
Grün	0	0	0	0	0	0	0	0
Türkisblau	0	0	0	0	0	0	0	0
Grün + Türkis	0	0	0	0	0	0	0	0
Lila	0	0	0	0	0	0	0	0
Beige/Braun	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0 <sup>1</sup>	1,0 <sup>1</sup>	1,0	1,0
Weiß	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 9.2** Sensitivität der verschiedenen Koloniefärbungen auf den untersuchten chromogenen Nährmedien nach 48 und 72 Stunden für die getesteten *Candida spp.* (<sup>1</sup> Sensitivität unter Einbeziehung der typischen rauen Morphologie) (Fortsetzung von Seite 111)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. med. habil. Uta-Christina Hipler für die freundliche Überlassung des Themas, die fortwährende Unterstützung in allen Phasen der Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Hautkrankheiten, insbesondere Frau Nadine Rahmig und Frau Dr. Kirsten Reddersen, für die Einweisung und Betreuung im Labor.

Herrn Dr. rer. nat. Mario Walther aus dem Institut für *Medizinische Statistik*, Informatik und Dokumentation danke ich für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und Auswertungen.

Mein abschließender Dank gilt allen weiteren Personen, die mich stetig motiviert und unterstützt haben, insbesondere meinen Eltern und meinem Mann, sowie Alexandra Schmidt.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. rer. nat. med. habil. Uta-Christina Hipler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers